

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

2010

Mgr. Eva Petrlíková

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

Mgr. Eva Petrlíková

**PROTITUBERKULÓZNÍ LÁTKY A JEJICH DALŠÍ
ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY**

Disertační práce

Hradec Králové

2010

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Inorganic and Organic Chemistry

Mgr. Eva Petrlíková

**ANTITUBERCULOSIS AGENTS AND THEIR
ANTIMICROBIAL EFFECTS**

Doctoral Thesis

Hradec Králové

2010

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

V Hradci Králové dne

Mgr. Eva Petříková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Karlu Waisserovi, DrSc., za vedení a pomoc při řešení studované problematiky.

Veliké poděkování patří celé katedře anorganické a organické chemie za umožnění vypracování daného úkolu. Jmenovitě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za měření a interpretaci NMR spekter, Ivě Vencovské za měření IČ spekter, Petru Jančárkovi za přípravu rozpouštědel, Idě Dufkové za hodnocení antibakteriální a antifungální aktivity, MUDr. Jarmile Kaustové, CSs. a RNDr. Jiřině Stolařikové ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě za hodnocení antimykobakteriální aktivity, PharmDr. Karlu Palátovi, CSc. za pomoc při matematickém modelování, Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc. za odborné připomínky a Prof. Dr. Reineru Beckertovi za umožnění studijní stáže na Univerzitě v Jeně. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Za významnou finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (grant GAUK 11809/2009/B-CH/FAF), grantu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV-2010-261-001) a výzkumnému záměru MŠMT ČR (MSM 0021620822).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Mgr. Eva Petrlíková

Školitel: Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc.

Název disertační práce: Protituberkulózní látky a jejich další antimikrobiální účinky.

Disertační práce je zaměřena na přípravu sloučenin s antimykobakteriální aktivitou. U řady látek byla hodnocena i antibakteriální a antifungální aktivita in vitro.

V rámci disertační práce bylo připraveno několik skupin sloučenin. Jednalo se o monosírné a disírné deriváty 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu, *N*-(pyridylmethyl) salicylamidy, monosírné a disírné deriváty 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu, *N*-benzylthiosalicylamidy, benzaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazony, salicylaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazony, deriváty 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu a hybridní molekuly cholesterolu a terpenů.

Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu vykazovaly 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion a 3-(3,4-dichlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion, 3-(4-*sek*-butylfenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on, *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamid a 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamid. Ze skupiny *S*-benzylisothiosemikarbazonů byl nejaktivnější salicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon. Z hybridních molekul vykazoval nejvyšší aktivitu [endo-(1*S*)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid. Aktivita *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů byla spíše střední až nízká. Z fenylesterů kyseliny salicylové byl nejaktivnější fenyl-4-methoxysalicylát.

U sírných derivátů 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu a u *N*-benzylthiosalicylamidů byla nalezena významná aktivita proti grampozitivním bakteriím. *N*-benzylthiosalicylamidy vykazují také antifungální aktivitu.

U 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů, 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů a u *N*-benzylthiosalicylamidů byla zjišťována antiproliferativní aktivita a cytotoxicita. U 3-(3,4-dichlorbenzyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu, 3-(3,4-dichlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-dithionu, 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu a *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu byla nalezena vysoká antimykobakteriální aktivita a zároveň jejich cytotoxicita je v rámci testovaných sloučenin spíše střední.

U *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů, sirných derivátů 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, *N*-benzylthiosalicylamidů a u fenylesterů kyseliny salicylové byla provedena studie lipofility na tenkých vrstvách oktadecysilanylizovaného silikagelu.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Inorganic Chemistry

Candidate: Mgr. Eva Petrlíková

Supervisor: Prof. RNDr. Karel Waisser, DrSc.

Title of Doctoral Thesis: Antituberculosis Agents and Their Antimicrobial Effects.

The dissertation focuses on the preparation of antimycobacterially active compounds. Some of the prepared compounds were also screened for the *in vitro* antibacterial and antifungal activity.

The prepared compounds included sulfur derivatives of 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, *N*-(pyridylmethyl)salicylamides, sulfur derivatives of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, *N*-benzylthiosalicylamides, benzaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones, salicylaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones, derivatives of 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-ylidene)-*N,N'*-diarylethane-1,2-diamine, and hybrid molecules of cholesterol and terpenes.

The highest antimycobacterial activity was exerted by 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione and 3-(3,4-dichlorobenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione, 3-(4-sec-butylphenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one, *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamide and 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamide. Salicylaldehyde-*S*-(4-chlorobenzyl)isothiosemicarbazone was the most active derivative in the group of *S*-benzylisothiosemicarbazones. [Endo-(1*S*)-(1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromide showed the highest antimycobacterial activity among the hybrid molecules of cholesterol and terpenes. The derivatives of *N*-(pyridylmethyl)salicylamide showed moderate to low activity against mycobacteria. Phenyl-4-methoxysalicylate was the most active among the phenylesters of salicylic acid.

The sulfur derivatives of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione and *N*-benzylthiosalicylamide were found to be antibacterially active. *N*-benzylthiosalicylamides also show effectivity against fungi.

3-Benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones and *N*-benzylthiosalicylamides were screened for antiproliferative activity and cytotoxicity. 3-(3,4-Dichlorobenzyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one,

3-(3,4-dichlorobenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-dithione, 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamide and *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamide exerted high antimycobacterial activity and their antiproliferative activity and cytotoxicity were found to be moderate among the tested compounds.

The lipophilicity of *N*-(pyridylmethyl)salicylamides, sulfur derivatives of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, *N*-benzylthiosalicylamides and phenyl salicylates was measured by thin layer chromatography on silica gel impregnated with trioctadecylsilane.

POUŽITÉ ZKRATKY

14/21d	14/21 dní
24/48h	24/48 hodin
72/120h	72/120 hodin
ACP	acyl carrier protein
ALS	acetolaktátsynthasa
CADD	Computer-Assisted Drug Design
Cipr	ciprofloxacin
cma1, cma2	cyclopropan mycolic acid synthasy
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
DAP	kyselina diaminopimelová
Ddn	dezaflavin-dependentní nitroreduktasa
desA1-3	desaturasy
DHAD	dihydroxyaciddehydratasa
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EF-G	elongační faktor
EF-Ts	elongační faktor
EF-Tu	elongační faktor
ETH	ethionamid
EthA	flavoprotein monooxygenasa
FAS-I	fatty acid synthase I
FAS-II	fatty acid synthase II
Flu	flukonazol
fMet-tRNA	<i>N</i> -formyl-methionyl-tRNA
FPP	farnesyldifosfát
FRD	fumarátreduktasa
galf	galaktofuranosa
galp	galaktopyranosa
GPP	geranyldifosfát
HeLa	cervikální buňky Henriety Lacks
HU-protein	histone-like protein
Huvec	human vein endothelial cells
IdeR	irondependentní represor

IF1-3	iniciační faktory
INH	izoniazid
InhA	enoyl-ACP-reduktasa
IPMD	isopropylmalátdehydrogenasa
IPMI	isopropylmalátisomerasa
IPMS	isopropylmalátsynthasa
IPP	isopentenyldifosfát
IR	infračervená spektroskopie
KARI	ketoacidreduktoisomerasa
KasA, KasB	beto-ketoacyl-ACP-synthasy
LAM	lipoarabinomanan
LBDD	Ligand-Based Drug Design
log MIC	dekadický logaritmus MIC
log P	logaritmus rozdělovacího koeficientu systému n-oktanol-voda
MabA	beto-ketoacylreduktasa
mAGP	mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex
MbtA	salicyl-AMP-ligasa
MbtB	neribozomální peptidsynthasa
MbtK	<i>N</i> -acyltransferasa
MbtL	acyl carrier protein
MbtM	acyl -AMP-ligasa
MbtN	acyl-CoA-dehydrogenasa
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mma1-4	methyltransferasy
mtFabH	beta-ketoacyl-ACP-synthasa III
NAP	PA-824
NDH	NADH-dehydrogenasa
Neom	neomycin
NMR	nukleární magnetická rezonance
NRPS	neribozomální peptidsynthasa
OSA	<i>N</i> -oktansulfonylacetamid
PBPs	penicilin binding proteins
Pen	penicilin G

Phen	fenoxymethylpenicilin
PI	fosfatidylinositol
PIMs	fosfatidylinositolmanosidy
PknA-L	serin/threonin kinasy
PKS	polyketidesynthasy
Pol I	DNA-polymerasa I
Pol III	DNA-polymerasa III
Pol-P	polyprenylfosfát
PTH	prothionamid
PZA	pyrazinamid
QSAR	quantitative structure-activity relationship
RF	retenční faktor
RF1-3	terminační faktory
Rha	rhamnosa
SBDD	Structure-Based Drug Design
SDH	sukcinátdehydrogenasa
SDH	sukcinátdehydrogenasa
SEDS	Shape, Division and Spoluration (rodina enzymů)
SL-I	sulfolipid - I
SSB-proteiny	rozmotávací proteiny
TDM	trehalosa-6,6'-dimykolát
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TLM	thiolaktomycin
TMM	trehalosa-6'-monomykolát
UDP-GlcNAC	UDP-N-acetylglukosamin
UDP-MurNAc	kyselina UDP-N-acetylmuramová
WHO	World Health Organisation
XDR-TB	extenzivní léková rezistence
δ	chemický posun v NMR
λ	vlnová délka
ν	vlnočet
π	Hanschova lipofilní substituentová konstanta
σ	Hammettova elektronická substituentová konstanta

OBSAH

1.	Úvod	19
2.	Teoretická část	21
2.1.	Tuberkulóza	21
2.2.	Charakteristika mykobakterií	21
2.3.	Léčba tuberkulózy	23
2.4.	Výzkum nových potenciálních léčiv	25
2.5.	Antimykobakteriální sloučeniny a potenciální cíle jejich účinku	27
2.5.1.	Buněčná stěna mykobakterií	27
2.5.1.1.	Biosyntéza arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu (APc)	29
2.5.1.2.	Antituberkulotikapůsobícínaúrovniarabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu (APc)	36
2.5.1.3.	Mykolové kyseliny	39
2.5.1.4.	Antituberkulotika působící na úrovni mykolových kyselin	44
2.5.1.5.	PKS systémy (Polyketidesynthases)	50
2.5.1.6.	Inhibitory sideroforů	54
2.5.2.	Syntéza leucinu, isoleucinu a valinu	54
2.5.2.1.	Inhibitory syntézy aminokyselin s rozvětveným řetězcem	54
2.5.3.	Syntéza cysteinu	54
2.5.3.1.	Inhibitory APS-reduktasy	56
2.5.4.	Respirační řetězec mykobakterií	56
2.5.4.1.	Antituberkulotika působící na úrovni respiračního řetězce	59
2.5.5.	Dvousložkové systémy mykobakterií	60
2.5.5.1.	Sloučeniny, u kterých se předpokládá působení na dvousložkové systémy ..	61
2.5.6.	Serin/threonin kinasy	61
2.5.6.1.	Inhibitory serin/threonin kinas	62
2.5.7.	Syntéza kyseliny listové	62
2.5.7.1.	Inhibitory dihydrofolátreduktasy	63
2.5.8.	Replikace bakteriální DNA	65
2.5.8.1.	Inhibitory replikace bakteriální DNA	67
2.5.9.	Dělení mykobakteriálních buněk	68
2.5.9.1.	Inhibitory buněčného dělení	69

2.5.10. Transkripce	69
2.5.10.1. Antituberkulotika inhibující RNA-polymerasu	70
2.5.11. Translace	71
2.5.11.1. Antituberkulotika působící na syntézu proteinů	74
2.5.12. Cytochromy P450 u mykobakterií	78
2.5.12.1. Inhibitory cytochromu P450	80
2.5.13. Sloučeniny s neobjasněným mechanismem účinku	80
3. Cíle disertační práce	83
4. Výsledky a diskuse	85
4.1. Monosírné a disírné deriváty 3-benzyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dionů	85
4.2. Syntéza, antibakteriální aktivita, antifungální aktivita a výzkum lipofility fenylesterů substituované kyseliny salicylové	91
4.3. <i>N</i> -(2-Pyridylmethyl)salicylamidy a <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamidy	99
4.4. Salicylanilidy	107
4.5. 3-(4-Alkylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithiony	109
4.6. Studium lipofility u 3-fenyl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-onů a 3-fenyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithionů	121
4.7. Syntéza a antimykobakteriální aktivita <i>N</i> -benzylthiosalicylamidů	131
4.8. Antimykotická aktivita <i>N</i> -benzylthiosalicylamidů	135
4.9. Antibakteriální aktivita <i>N</i> -benzylthiosalicylamidů	143
4.10. Nové <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazony s antimykobakteriální aktivitou	149
4.11. Deriváty esterů cholesterolu/terpenů a alkanových kyselin substituovaných dusíkatými bázemi	161
4.12. Deriváty 1,2-bis(9 <i>H</i> -fluoren-9-yliden)- <i>N,N'</i> -diarylethan-1,2-diaminu a jejich antimykobakteriální aktivita	171
5. Závěr	175
6. Citovaná literatura	179
7. Publikační činnost	197
8. Přílohy	203

1. ÚVOD

Tuberkulóza (TBC), dříve nazývaná též souchotiny či úbytě, patří mezi infekční bakteriální onemocnění a i v současné době představuje závažný celosvětový problém. Podle Světové zdravotní organizace (WHO) bylo v roce 2008 celosvětově diagnostikováno 9,4 miliónů nových případů tohoto onemocnění. Jedná se o nárůst oproti roku 2007, kdy bylo zjištěno 9,3 miliónů nových případů.

Mezi těmito novými případy se vyskytlo 1,4 miliónů případů u HIV pozitivních osob. Velké nebezpečí představují zejména multirezistentní kmeny, které tvoří 5 % nových případů. Jedná se o nejvyšší počet MDR-TB, který byl kdy zaznamenán (1).

Podle dat z registru TBC se v roce 2009 v České republice vyskytlo 710 případů onemocnění tuberkulózou (tj. 6,8 případů na 100 tisíc obyvatel). Nově zjištěných onemocnění bylo hlášeno 688 a recidiv 22. Nejvíce postižený byl kraj Hl. m. Praha (10,3 případů na 100 tisíc obyvatel), kraj Ústecký (9,1), Středočeský (9,0), dále následují kraje Plzeňský (8,4), Pardubický (7,6) a Jihomoravský (6,9). Nejméně postižený byl naopak kraj Jihočeský a Vysočina. WHO a Evropská unie přitom považují za kritérium nízké prevalence 20 onemocnění na 100 tisíc obyvatel, což dlouhodobě nepřesahuje žádný kraj v České republice. Velkým problémem je šíření tuberkulózy z jiných zemí. Co se týká počtu nemocných cizinců v ČR, pocházelo nejvíce případů z Ukrajiny (34), Vietnamu (30) a Slovenska (26). Mezi bezdomovci bylo zaznamenáno celkem 43 případů (2).

Velké nebezpečí představují zejména multirezistentní kmeny a také vzestup a zhoršování epidemiologické situace tuberkulózy v souvislosti s růstem onemocnění AIDS v celém světě, zejména v zemích s nedostatečnou lékařskou péčí. Aktuálním tématem mnoha vědeckých výzkumů je tedy vývoj nových antituberkulotik s novým mechanismem účinku, nízkou toxicitou a umožňující současné podání s léky užívanými v terapii onemocnění AIDS.

Infekční nemoci zůstávají závažným problémem i přes neustálý rozvoj medicíny. Zatímco výskyt některých onemocnění se podařilo snížit, jiná zůstávají stále aktuální nebo s postupem času nabývají na významu. Mezi stále akutnější problémy patří i nemoci vyvolané houbovými organismy, zejména systémové mykózy. Jedná se o onemocnění, se kterými se stále častěji setkáváme v transplantačních a hematoonkologických zařízeních a na jednotkách intenzivní péče. Rizikovou skupinou jsou lidé se sníženou imunitou, ať již ve spojení s prodělanou

transplantací, infekcí virem HIV, rakovinou, nebo dalšími okolnostmi, které oslabují lidský organismus. Nebezpečná je i vzrůstající rezistence patogenů na jednotlivé léčebné prostředky (3).

Řešení rezistence je aktuální i v případě dalších patogenních organismů jakými jsou např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae* a *Clostridium difficile* (4).

I podle WHO je problém s rezistencí patogenních organismů vysoce aktuální (5). Ačkoliv je tedy tato disertační práce zaměřená na přípravu sloučenin s antimykobakteriálním účinkem, byla řada připravených látek otestována i proti dalším bakteriím a také proti houbovým organismům.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza je infekční onemocnění, které způsobuje nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis komplex* (6). Tuberkulóza se šíří prostřednictvím kapének pocházejících od osob trpících aktivní formou tuberkulózy. Odhaduje se, že člověk trpící aktivní tuberkulózou nakazí průměrně 10 až 15 lidí ročně (7).

Při onemocnění tuberkulózou dochází ke vzniku tzv. specifického zánětu, jehož podstatou je tvorba tuberkulózních uzlíků (8). Tuberkulózní uzlík (granulom) je tvořen epiteloidními buňkami, které vznikají přeměnou makrofágů, fagocytujících mykobakterií a buňkami Langhansovými, které vznikají splýváním většího počtu makrofágů. Mykobakterie jsou zde uloženy především intracelulárně (9). Tyto uzlíky mohou podléhat kaseózní nekróze. U odumřelých částí tkáně dochází k tzv. kalcifikaci (ukládání vápenatých solí). Při nepříznivém průběhu onemocnění může nekróza zkapalnět (kolikvovat) a může dojít ke vzniku kaverny a k dalšímu šíření infekce a zánětu.

Nejčastější formou tuberkulózy je forma plicní, může ale dojít k napadení i dalších orgánů, například ledvin, střev, mízních uzlin, kůže, kostí či kloubů (8). Ke vstupu infekce do lidského organismu dochází více než z 80 % prostřednictvím dýchacího ústrojí, možný je též transplacentární přenos do krevního oběhu plodu (9). U oslabených jedinců může dojít k mohutnému rozsevu drobných ložisek v celém organismu, tzv. miliární tuberkulóze. Nebezpečím je také těžký tuberkulózní zánět plic nebo bazilární meningitida. Postupné šíření tuberkulózy v plicích s četnými rozpady může vést k hemoptýze provázené vykašlováním krve a také k šíření onemocnění do dalších orgánů (8).

K diagnostice tuberkulózy se využívá rentgenové vyšetření, test kožní citlivosti na tuberkulin (směs antigenů připravená z mykobakteriálních těl), bronchoskopie a bioptická vyšetření tkání. Z laboratorních technik se používají mikroskopická a kulturační vyšetření na přítomnost mykobakterií. K typizaci kultur se využívají molekulárně genetické metody (10)

2.2. Charakteristika mykobakterií

Pro mykobakterie komplexu *M. tuberculosis* je charakteristická 99,9% sekvenční podobnost genomů s identickými sekvencemi 16S rRNA. Ačkoliv všechny pravděpodobně pochází ze

společného předka, liší se jednotlivé mykobakterie v preferenci svých hostitelů, fenotypu a v patogenitě. Některé lze považovat za výhradně lidské (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*), hostitelem *M. microti* jsou hlodavci a naopak *M. bovis* vykazuje spektrum hostitelů poměrně široké (11).

Jaký je tedy vlastně původ tuberkulózy u lidí a u zvířat? Při hledání společného předka mykobakterií se nejdříve předpokládalo, že k rozrůznění komplexu *M. tuberculosis* došlo přibližně před 15 000 až 20 000 lety. Předpokládalo se rovněž, že *M. tuberculosis* evolučně vychází z *M. bovis* a že v průběhu domestikace zvířat došlo k adaptaci původně zvířecího patogenu na člověka (12).

Komparativní genomová analýza a analýza deleční ale prokázaly, že společnému předku mykobakterií řazených do komplexu *M. tuberculosis* se nejvíce blíží současné kmeny *M. tuberculosis* (13).

Teorii, že by společným předkem bylo *M. bovis*, vyvrací i výzkum prováděný na 85 egyptských mumiích. U těchto mumií, pocházejících z let 2050–1650 př. n. l., byla provedena analýza DNA (spoligotyping – studium polymorfizmů na základě určitých opakujících se jednotek DNA). Vědci došli ke zjištění, že se mykobakterie způsobující tuberkulózu v tehdejších dobách nejvíce podobají současnému *M. tuberculosis* a *M. africanum*. Naopak shoda s *M. bovis* nebyla potvrzena (12).

Jako nejpravděpodobnější se tedy ukazuje teorie, podle které komplex *M. tuberculosis* vychází ze společného předka a teprve v průběhu času došlo postupně k oddělení jednotlivých vývojových linií. Zdá se, že *M. bovis* je členem oddělené vývojové linie, do níž je možné zařadit i *M. africanum* a *M. microti*. Lze také předpokládat, že společný předek komplexu *M. tuberculosis* byl od samého počátku lidským patogenem (11).

Kromě komplexu *M. tuberculosis* může být tuberkulóza způsobena i jinými mykobakteriemi. Mykobakterie jsou dle konvenčního způsobu rozdělena do čtyř nebo pěti skupin podle určitých, charakteristických vlastností. Mezi tato kritéria patří zejména patogenita pro člověka a pro zvířata, rychlost růstu, optimální teplota pro růst a také vliv viditelného světla na tvorbu pigmentu (14).

Mezi obligátně patogenní mykobakterie pro člověka řadíme *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. leprae*.

Mykobakterie pro člověka podmíněně patogenní způsobují tzv. mykobakteriíózy. Mezi tyto mykobakterie řadíme *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. ulcerans* a *M. marinum*. Příkladem nepatogenních mykobakterií je *M. aquae* (9).

Velké nebezpečí pro člověka představuje také *Mycobacterium avium* komplex. Jeho mykobakterie vykazují konstantní primární rezistenci vůči antituberkulotikům a představují riziko zejména pro pacienty nakažené virem HIV (9). Podle WHO mají lidé infikovaní virem HIV a zároveň i tuberkulózou 20 až 40 krát vyšší pravděpodobnost, že se u nich vyvine aktivní forma tuberkulózy než HIV negativní lidé žijící v téže zemi (7).

Do komplexu *M. avium* se řadí *M. avium*, *M. intracellulare* a někdy též *M. scrofulaceum*. Na základě analýzy nukleových kyselin lze *M. avium* dále rozlišit na *M. avium* spp. *avium*, *M. avium* spp. *paratuberculosis* a *M. avium* spp. *silvaticum* (14).

Zařazení mykobakterií do systému organismů:

Kmen:	Actinobacteria
Řád:	Actinomycetales
Podřád:	Corynebacterineae
Čeleď:	Mycobacteriaceae
Rod:	Mycobacterium

Fyziologie *M. tuberculosis*

Bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, která způsobuje většinu případů tuberkulózy, byla poprvé objevena Robertem Kochem v roce 1882 (15). Jedná se o imobilní tyčinkovitou nesporulující bakterii, která je rovná nebo zahnutá, velká 1,5–5 µm (9). K optimálnímu růstu této bakterie dochází při teplotě 37–38 °C a její generační čas se pohybuje v rozmezí 20 až 48 hodin. Jedná se o bakterie velmi odolné vůči vyschnutí, které tak mohou dlouho přežívat v prachu nebo na předmětech znečištěných sputem nemocných (16). Pro mykobakterie je charakteristická acidorezistence, tj. obtížná barvitelnost organickými barvivy a následná odolnost k odbarvení kyselinami, zásadami a alkoholem. Tato vlastnost je dána vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně a pouze zřídka se vyskytuje u jiných bakterií (17). Mykobakterie lze dobře barvit např. Ziehl-Neelsenovým činidlem, které jim dodává červenou barvu odolávající odbarvení roztokem HCl (aq) (15).

2.3. Léčba tuberkulózy

Léčba tuberkulózy v současné době spočívá v podávání vhodně zvolených kombinací antituberkulotik. Používaná antituberkulotika lze rozdělit do tří linií:

Antituberkulotika 1.linie (základní antituberkulotika)

Isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol a pyrazinamid.

Antituberkulotika 2.linie (rezervní antituberkulotika)

Ethionamid, cykloserin, kyselina *p*-aminosalicylová, amikacin, kapreomycin a fluorochinolony.

Antituberkulotika 3. linie

Makrolidy (klaritromycin), amoxycilin, imipenem, klofazimin.

Hlavní zásadou je zvolení takového léčiva – kombinace léčiv, vůči kterému jsou patogenní bakterie citlivé. Vlastní medikaci tak předchází hodnocení citlivosti konkrétní mykobakterie na léčivo. Při zjištění citlivé formy tuberkulózy jsou aplikována antituberkulotika první linie. V případě zjištění rezistence patogenu musí dojít k modifikaci léčby a do léčebného režimu se zařazují i antituberkulotika druhé linie. Do medikace lze případně zařadit i léčiva, která nejsou sice v České republice registrována, ale byla u nich zjištěna citlivost vůči patogenní bakterii. Dle stupně rezistence lze tuberkulózu charakterizovat následovně:

Jako o monorezistentní tuberkulóze hovoříme v případě, kdy prokázané mykobakterium je při testu citlivosti *in vitro* rezistentní pouze na antituberkulotikum první řady.

Označením polyrezistentní tuberkulóza rozumíme situaci, kdy kmen je rezistentní na více než jedno antituberkulotikum první řady s výjimkou současné rezistence na kombinaci INH a rifampicinu.

Pokud je patogenní bakterie rezistentní minimálně na kombinaci INH a rifampicinu lze již tuberkulózu označit za multirezistentní MDR-TB.

Rozsáhlá rezistence, kdy patogen kromě rezistence na kombinaci INH a rifampicinu vykazuje rezistenci minimálně na další tři antituberkulotika druhé řady byla označena Světovou zdravotní organizací v březnu 2006 jako extenzivní léková rezistence (XDR-TB). Druhá definice podle WHO z listopadu téhož roku definuje XDR-TB jako onemocnění, kdy byla u patogenu kromě multirezistence zaznamenána i odolnost vůči jakémukoliv fluorochinolonovému antituberkulotiku a zároveň i vůči minimálně jednomu ze tří parenterálních antituberkulotik-capreomycin, kanamycin a amikacin (6).

2.4. Výzkum nových potenciálních léčiv

Psal se rok 1928, když Alexander Fleming našel zelenou plíseň rostoucí na povrchu kultury bakterie *Staphylococcus aureus*. V místech, kde se tato plíseň stýkala s bakteriemi, pozoroval lyzi bakteriálních buněk. Je docela dobře možné, že byli i jiní vědci, kteří pozorovali podobný jev, ale Fleming byl jednoznačně první, který se na tuto skutečnost zaměřil. Každopádně lze však objev penicilinu označit za náhodný nálezný léčivé sloučeniny aniž by byla známa tzv. vůdčí struktura (18).

Vyhledávání vůdčích struktur (tzv. lead structures) je v současné době obvykle prvním krokem při výzkumu nového léčiva. Tato základní struktura je poté obměňována tak, aby bylo dosaženo optimálního léčebného efektu. Vůdčí strukturou tak mohou být jak nově připravené sloučeniny, u kterých je zjišťována jejich biologická aktivita, tak i biologicky aktivní látky přírodního původu (19). Studium přírodních zdrojů vedlo například k objevu streptomycinu izolovaného z půdních organismů (20). Vůdčí struktura může být nalezena i na základě studia vedlejších účinků léčiv. Nejednou se stalo, že vedlejší účinek určité sloučeniny převládl a stal se tak hlavním, pro který je daná látka využívána. Nebo se daná sloučenina stala pro svůj vedlejší účinek novou vůdčí strukturou. Příkladem je antibakteriálně aktivní karbutamid, u kterého byl zjištěn antidiabetický vedlejší účinek a který se stal vůdčí strukturou pro přípravu tolbutamidu (18).

Vůdčí strukturu lze získat i přípravou strukturních analogů k přirozeným substrátům enzymů a receptorů. Dobrým zdrojem jsou i buněčné metabolity, které lze pomocí malých strukturních obměn přeměnit na antimetabolity. Jako příklad antimetabolitů lze uvést inhibitory dihydrofolátreduktasy, mezi které patří např. kyselina *p*-aminosalicylová.

S rozvojem výpočetní techniky našly uplatnění zejména matematické přístupy, které na základě databází farmakoforů umožňují provést návrh nových účinných struktur (19). Pro výzkum léčiva je velmi důležitou záležitostí objev tzv. farmakoforu. Jedná se o určitou část vůdčí struktury, která je zodpovědná za biologickou aktivitu, například za interakci s receptorem (18).

Projektování léčiv s podporou počítače (Computer-Assisted Drug Design, CADD) se vyvinulo na základě studia vlastností léčiv a patří mezi moderní přístupy. Metoda CADD pracuje se dvěma základními přístupy. Prvním přístupem je přímé, strukturou řízené projektování léčiv (structure-based drug design, SBDD), které lze použít v případě, že je známa přesná struktura cílového receptoru. Pokud není přesná struktura receptoru známa, lze použít přístup

tzv. ligandově řízeného projektování léčiv (ligand-based drug design, LBDD) při kterém se porovnávají strukturní vlastnosti skupiny ligandů se známou biologickou aktivitou s cílem nalézt jejich společný farmakofor (21). Metody CADD závisí na množství informací, které máme o ligandu a o receptoru. V nejideálnějším případě je dostupná informace o trojrozměrné struktuře receptoru i o komplexu ligand-receptor. Tyto informace lze získat např. metodou rentgenové difrakce nebo nukleární magnetické rezonance (NMR). K predikci vazebné afinity protein-ligandového komplexu se známou trojrozměrnou strukturou lze použít metodu SCORE. Tato metoda umožňuje optimalizovat vedoucího kandidáta z hlediska racionálního lékového designu. Dalším přístupem je QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) při kterém se využívá korelace strukturních a charakterových vlastností látek s biologickou aktivitou. Fyzikálně chemické vlastnosti (hydrofobnost, topologie, elektronové vlastnosti a prostorové efekty) jsou determinovány empiricky nebo pomocí výpočetních metod. Další metodou je komparativní molekulární analýza (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA), která se stala významným nástrojem v trojrozměrných studiích s QSAR (3D QSAR). Je nezbytné ale podotknout, že výpočetní technika nemůže nahradit úplné pochopení studovaného biologického systému, ale může pouze pomoci při porozumění chemické a biologické stránce problému (22).

Mezi formy výzkumu nesporně patří i využití biotechnologických metod, zejména rekombinantních technik a genového inženýrství. Velký význam má také poznávání genomu jednak patologických organismů, jednak genomu lidského (19). Sekvencování genomu se nejvíce uplatňuje u bakterií. Mezi organismy, jejichž genom byl detailně prozkoumán, patří např. *C. albicans*, *E. coli*, *B. subtilis*, *H. influenzae* a *H. pylori* (21). V roce 1998 byla v Nature publikována i práce týkající se genomu *M. tuberculosis* (23). Zjištěné rozdíly mezi lidským genomem a genomem patogenu lze využít k projektování léčiv, jejichž účinek je zacílen přímo na patogenní organismus a která tak představují pokud možno minimální zátěž pro člověka.

Cílená syntéza sloučenin na základě porozumění biologickým mechanismům účinku a chemickým strukturám biologických systémů je novým a perspektivním způsobem výzkumu léčiv (22). V následující kapitole (kapitola 2.5) jsou sloučeniny s antimykobakteriální aktivitou rozděleny dle mechanismu účinku. Cílem bylo poskytnout přehled struktur, u kterých je cíl jejich působení znám, nebo alespoň předpokládán a mohou tak sloužit jako inspirace pro přípravu dalších potenciálních léčiv s antimykobakteriální aktivitou.

2.5. Antimykobakteriální sloučeniny a potenciální cíle jejich účinku.

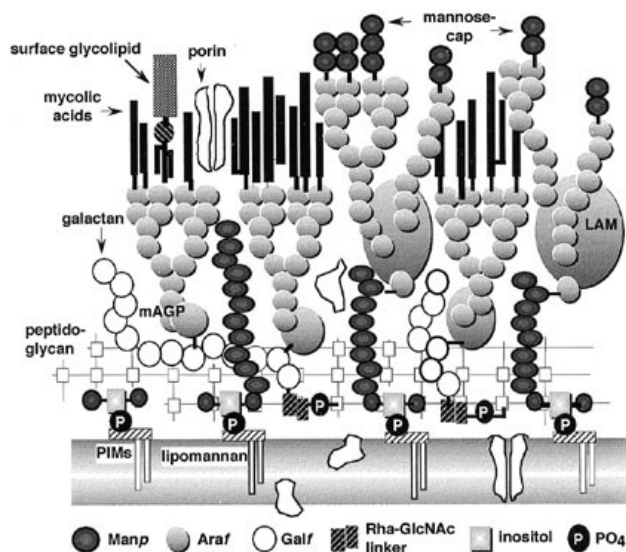
Potenciálními cíly účinku antituberkulotik mohou být zejména následující struktury a procesy mykobakteriální buňky:

1. Buněčná stěna mykobakterií (arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex, mykolové kyseliny a PKS systémy)
2. Syntéza leucinu, isoleucinu a valinu u mykobakterií (tedy aminokyselin s rozvětveným řetězcem)
3. Syntéza cysteinu v mykobakteriální buňce
4. Respirační řetězec mykobakterií
5. Dvousložkové systémy mykobakterií
6. Serin/threonin kinasy
7. Syntéza kyseliny listové
8. Replikace mykobakteriální DNA
9. Proces dělení mykobakteriální buňky
10. Transkripce u mykobakterií
11. Translace u mykobakterií
12. Mykobakteriální cytochromy

2.5.1. Buněčná stěna mykobakterií

Buněčná stěna mykobakterií se skládá ze tří typů navzájem spojených makromolekul (Obr.1). Vnější lipidovou část tvoří mykolové kyseliny, což jsou rozvětvené mastné kyseliny obsahující 70 až 90 atomů uhlíku (24). Mezi významné mykolové kyseliny patří např. trehalosa 6,6'-dimykolát (TDM) a její biosyntetický prekurzor trehalosa 6'-monomykolát (TMM), které mají funkci silných antigenů (25).

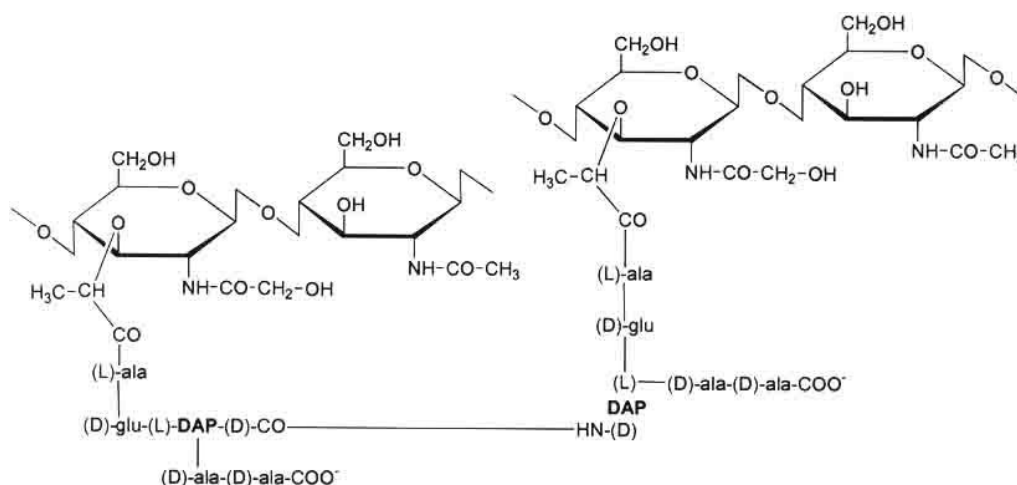
Mykolové kyseliny jsou esterovou vazbou připojeny



Obrázek 1: Buněčná stěna mykobakterií. Převzato z Chatterjee, Khoo, 1998 (28).

k vrstvě arabinogalaktanu, což je polymer skládající se hlavně z D-galaktofuranosylové a D-arabinofuranosylové části, které jsou spojeny glykosidickou vazbou. Arabinogalaktan je pomocí disacharidu α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 3)- α -D-N-acetyl-glukosaminosyl-1-fosfátu připojen ke kyselině muramové. Kyselina muramová je součástí peptidoglykanové vrstvy tvořící nejvnitřnější část buněčné stěny mykobakterií (24).

Vrstva peptidoglykanu se skládá z polysacharidového řetězce tvořeného opakujícími se jednotkami N-acetyl- β -D-glukosaminyl-(1 \rightarrow 4)-N-glykolylmuramové kyseliny (26). Ačkoliv strukturu peptidoglykanu lze označit jako strukturu A γ typu (jeden z nejčastějších bakteriálních typů peptidoglykanu), existují zde určité odlišnosti. Jedná se zejména o skutečnost, že peptidoglykan obsahuje kyselinu N-glykolylmuramovou místo kyseliny N-acetylmuramové. Kyselina muramová dále obsahuje tetrapeptidové (L-alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimelyl-D-alanin) postranní řetězce. Vazba se přitom může vyskytovat jak mezi dvěma meso-diaminopimelovými kyselinami, tak mezi kyselinou diaminopimelovou a D-alaninem (Obr. 2).

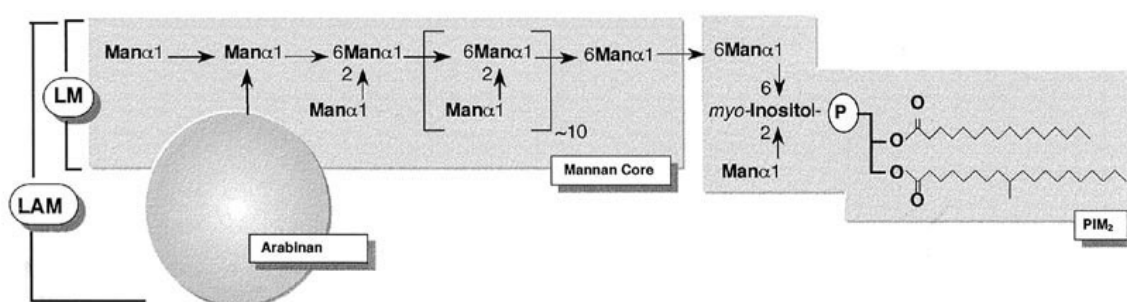


Obrázek 2 Peptidoglykanová vrstva buněčné stěny mykobakterií. Převzato z: Schroeder a kol., 2002 (26).

Peptidoglykan, arabinogalaktan a mykolové kyseliny tvoří dohromady tzv. mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex (mAGP) (27)

K mAGP komplexu je dále nekovalentně připojen lipoarabinomannan (LAM), jehož molekula se skládá z fosfatidylinositolu, mannanu a arabinanu, který je strukturně podobný arabinanu v mAGP-komplexu (27). Základem struktury lipoarabinomannanu je hlavní α 1 \rightarrow 6 řetězec, který se přímo připojuje na 6-pozici myo-inositolu, který je součástí fosfatidylinositolu (PI) (Obr. 3). Z mastných kyselin, které jsou součástí fosfatidylinositolu převažují zejména

kyselina palmitová (C16:0) a 10-methyloktadekanová (k. tuberkulostearová, C19) a dále malé množství kyselin C14:0, C17:0, methyl-C17:0 a C18:0. Otázka mastných kyselin doposud nebyla plně vyřešena. Na jedné straně byly nalezeny kmeny mající dva až čtyři acylové řetězce, na straně druhé byl izolován i kmen *M. smegmatis*, který měl naopak neacylovaný fosfoinositol-glycerol. Je tedy téměř jisté, že zde existuje určitá heterogenita mezi jednotlivými kmeny, a to jak v pozici, tak i ve stupni acylace lipoarabinomannanu (28). LAM vykazuje celou řadu biologických vlastností. Pravděpodobně se podílí na patogenezi a to tak, že inhibuje aktivaci T-buněk a makrofágů. Dále inhibuje aktivitu proteinkinasy C a indukci makrofágů (26).



Obrázek 3 Struktura lipoarabinomannanu. Převzato z Chatterjee, Khoo, 1998 (28).

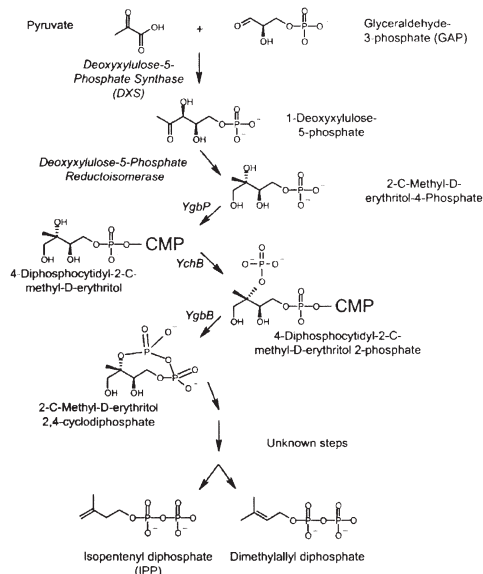
Kromě LAM obsahuje buněčná stěna mykobakterií celou řadu dalších lipidů, které jsou kovalentně vázány k mAGP komplexu. Jedná se např. o glykolipidy obsahující trehalosu, fenolické glykolipidy, glykopeptidolipidy, lipooligosacharidy, fosfatidylinositolmannosidy (PIMs), fosfatidylethanolaminy a triacylglyceroly (26).

2.5.1.1. Biosyntéza arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu (APc)

Biosyntéza APc může být rozděleně do tří částí: syntéza polyprenylfosfátu (Pol-P), peptidoglykanu a arabinogalaktanu (29).

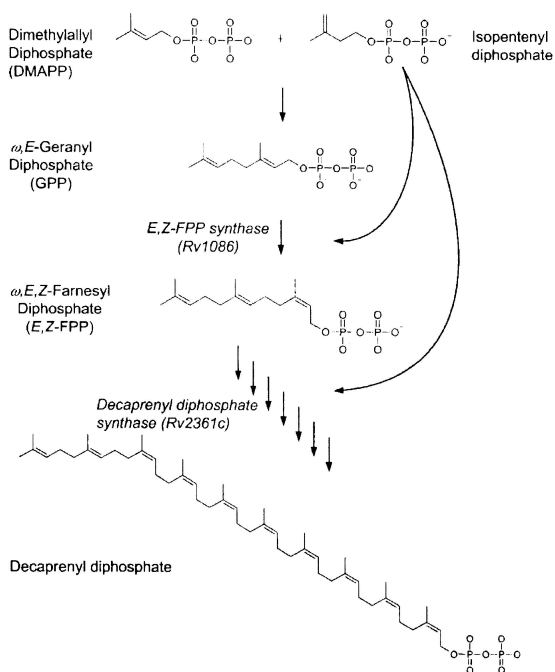
Syntéza polyprenylfosfátu (Pol-P)

Je již dlouho známo, že polyprenylfosfát (Pol-P) má velký význam pro syntézu buněčné stěny (30). Bylo například zjištěno, že pomalu rostoucí kmeny *M. tuberculosis* syntetizují Pol-P mnohem pomaleji než rychle rostoucí kmeny *M. smegmatis* (31). Dále se předpokládá, že syntéza mykobakteriální buněčné stěny vychází konkrétně z dekaprenylfosfátu (29).



Obrázek 4: Syntéza isopentenyl diphosfátu. Převzato z Crick a kol., 2001 (29)

isopentenyl diphosfátu jsou následně přikládány k rostoucímu řetězci (dochází ke 1'-4 head to tail kondenzaci (34)) dokud se nevytvoří molekula geranyl diphosfátu (GPP) a farnesyl diphosfátu (FPP). Prodlužování řetězce pokračuje stejným způsobem až do vzniku polyprenyl diphosfátu.



Obrázek 5: Syntéza dekaprenyl diphosfátu. Převzato z Crick a kol., 2001 (29)

Prvním krokem při syntéze Pol-P je vytvoření isopentenyl diphosfátu (IPP) (Obr. 4), který začíná kondenzací glyceraldehyd-3-fosfátu s pyruvátom za vzniku 1-deoxyxylulosa-5-fosfátu. 1-Deoxyribulosa-5-fosfát je dále přeměněn na 2-C-methyl-D-erythritol-4-fosfát a ten poté v dalších krocích na isopentenyl diphosfát (32). Doposud je znám pouze jediný gen této biosyntézy, a to konkrétně Rv2682c, který kóduje 1-deoxyxylulosa-5-fosfát syntázu (33).

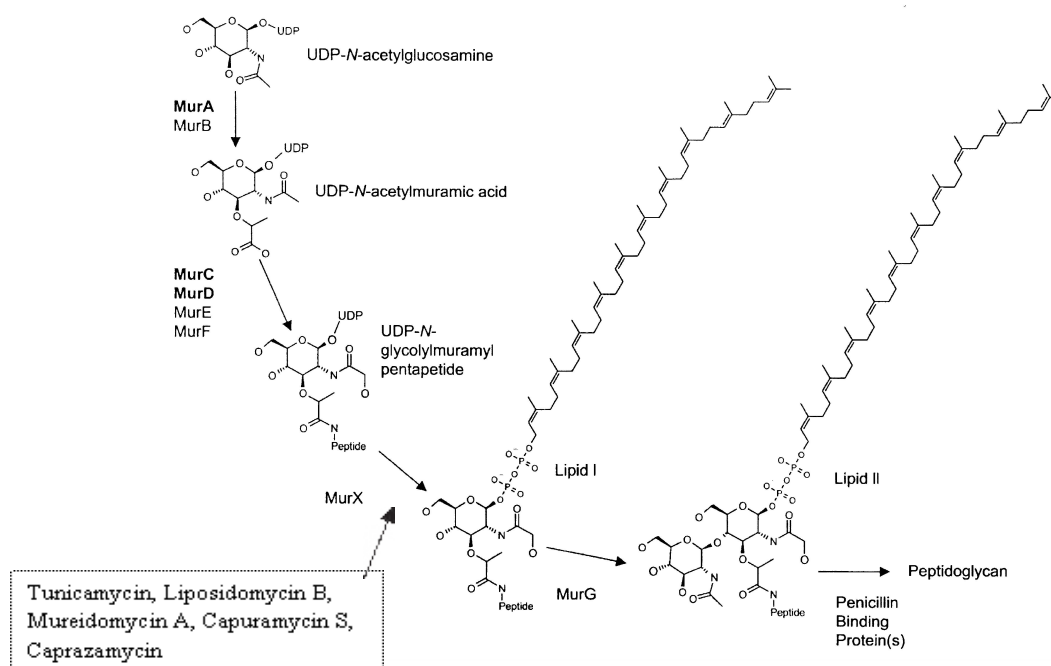
Jakmile dojde k vytvoření IPP, následuje jeho přeměna na dimethylallyl diphosfát (DMAPP) (Obr. 5). Přesný mechanismus zatím není znám, pravděpodobně se jej může, ale nemusí účastnit enzym isomerasa (29). Molekuly

isopentenyl diphosfátu jsou následně přikládány k rostoucímu řetězci (dochází ke 1'-4 head to tail kondenzaci (34)) dokud se nevytvoří molekula geranyl diphosfátu (GPP) a farnesyl diphosfátu (FPP). Prodlužování řetězce pokračuje stejným způsobem až do vzniku polyprenyl diphosfátu. Jakmile je dosaženo potřebné délky řetězce, dochází k defosforylaci polyprenyl diphosfátu na polyprenylmonofosfát. Doposud se neví, zda polyprenylmonofosfát vzniká jednoduchou defosforylací polyprenyl diphosfátu nebo zda se z polyprenyl diphosfátu odštěpují oba fosfáty a takto vzniklý alkohol je následně refosforylován kinasou (29). Z enzymů podílejících se na této přeměně jsou známy E,Z-FPP-synthasa kódována genem Rv1086 (35) a dekaprenyl diphosfát syntáza kódovaná genem Rv2361c (36).

Bakterie kmene *M. smegmatis* obsahují dvě formy polyprenolfosfátu a to dekaprenylfosfát a heptaprenylfosfát (37), zatímco u *M. tuberculosis* se nachází pouze dekaprenylfosfát (31).

Syntéza peptidoglykanu

Syntéza peptidoglykanu (Obr. 6) byla u *M. tuberculosis* doposud velmi málo prozkoumána. Předpokládá se její podobnost se syntézou peptidoglykanu u *E. coli* (29). Nejprve jsou v cytoplasmě přítomnými enzymy syntetizovány prekurzory. Tyto prekurzory jsou následně přeneseny přes membránu pomocí v tučích rozpustného přenašeče a připojeny k peptidoglykanu.



Obrázek 6: Syntéza peptidoglykanu. Převzato z Crick a kol., 2001 (29)

Průběh syntézy peptidoglykanu

V první části dochází k syntéze prekurzorů. V iniciální reakci je fosforylací aktivovaný *N*-acetylglukosamin-1-P podruhé aktivován uridintrifosfátem (UTP) za vzniku UDP-*N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc). Takto je tedy připraven první prekurzor. Druhý prekurzor, kyselina UDP-*N*-acetylmuramová (UDP-MurNAc) vzniká reakcí UDP-*N*-acetylglukosaminu s fosfoenolpyruvátem a následnou redukcí enoylpyruvátové skupiny (38). Reakce vedoucí ke vzniku UDP-MurNAc jsou katalyzovány enzymem fosfoenolpyruvát:UDP-GlcNAc-enoylpyruváttransferasou (murA, gen Rv1315). V dalším kroku je připojením L-alaninu, kyseliny D-glutamové, kyseliny meso-diaminopimelové (DAP) a D-alanyl-D-alanindipeptidu na UDP-MurNAc vytvořen UDP-*N*-acetylmuramylpentapeptid. U *E. coli* se na těchto reakcích podílí enzymy MurC, MurD, MurE a MurF (29). U *M. tuberculosis* byly doposud objeveny pouze

enzymy MurC (L-alaninligasa, gen Rv2152c) (39) a MurD (D-glutamátligasa, gen Rv2155c). U *M. tuberculosis* navíc dochází k oxidaci *N*-acetylové skupiny a výsledným je produktem je UDP-*N*-glykolylmuramylpentapeptid namísto UDP-*N*-acetylmuramylpentapeptidu. Doposud ale nebylo objasněno, kdy přesně dochází k této oxidaci a které enzymy se na této modifikaci podílí (29).

UDP-*N*-glykolylmuramylpentapeptid je přenesen na molekulu undekaprenylfosfátu, který je přítomen v membráně a dojde k vytvoření tzv. Lipidu I. Na tomto přenosu se podílí enzym MurX. Undekaprenylfosfát udílí celému komplexu hydrofobní vlastnosti a umožňuje průchod hydrofobní vrstvou membrány. Zdrojem energie pro reakci je UDP. Uvolněný UMP je fosforylován na UTP a může být využit v novém cyklu.

Na membráně dále dochází k připojení *N*-acetylglukosaminu pomocí enzymu MurG a vzniká tak Lipid II (nazýván též muropeptid) (29). Tvorba Lipidu I a II jsou poslední kroky, ke kterým dochází v cytoplasmě. Lipid II je následně transportován přes cytoplasmatickou membránu do periplasmatického prostoru. Mechanismus tohoto přenosu není doposud znám (40).

Jednotlivé glykanové řetězce jsou následně spojovány pomocí peptidových můstků. U *E. coli* je hlavní vazbou vazba mezi předposledním D-alaninem jednoho peptidového řetězce a DAP druhého peptidového řetězce. Tato reakce je katalyzována penicilin vázajícími proteiny (penicilin binding proteins, PBPs) a zahrnuje rozštěpení vazby D-alanyl-D-alanin donorového peptidu, čímž vznikne energie potřebná pro uskutečnění reakce (29).

PBPs jsou klasifikovány podle své molekulové hmotnosti. Jedná se o enzymy působící jako peniciloylserintransferasy, které katalyzují rozštěpení cyklické amidové vazby penicilinu. Vysokomolekulární PBPs jsou enzymy obsahující *N*-terminální-penicilin-nevazebnou část a C-terminální-penicilin-vazebnou část. PBPs se dále dělí na základě své primární struktury do tříd A a B. Vysokomolekulární PBPs třídy A mají u *E. coli* funkci transglykosylasy a transpeptidas. U *M. tuberculosis* byly objeveny čtyři PBPs, ale doposud nebylo ověřeno, zda fungují také jako transpeptidasy a transglykosylasy.

U *M. tuberculosis* se dvě třetiny peptidových vazeb nachází mezi karboxylovou skupinou terminálního D-alaninu a aminoskupinou D-centra DAP čímž vzniká vazba D, D. Zbývající jednu třetinu tvoří vazby mezi karboxylovou skupinou L-centra terminální DAP jednoho řetězce a aminoskupinou D-centra DAP druhého řetězce. Vznikají tak vazby L, D. Tento poznatek napovídá o existenci jak D, D tak i L,D-transpeptidas, ačkoliv tyto L,D-transpeptidasy nebyly doposud identifikovány.

Dosavadní znalosti naznačují, že kromě tvorby amidových vazeb a vzniku kyseliny *N*-glykolylmuramové namísto kyseliny *N*-acetylmuramové je průběh syntézy peptidoglykanu u *M. tuberculosis* a *E. coli* podobný. (29).

Syntéza arabinogalaktanu

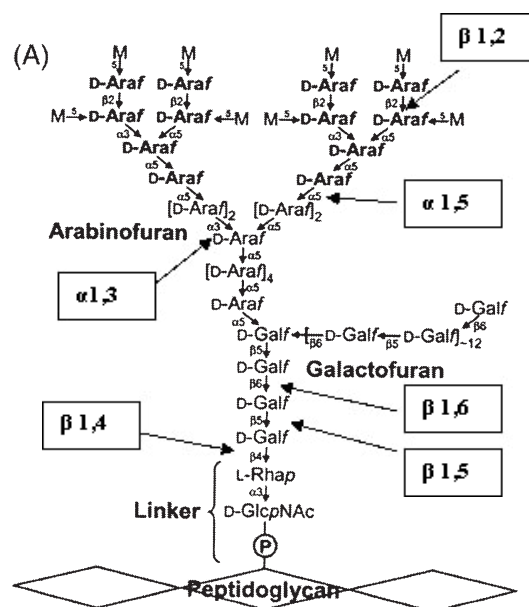
Arabinogalaktanová vrstva (Obr. 7) se skládá z galaktanu, arabinanu a lze sem zařadit i Rha- α -1,3-GlcNAc-disacharid. Rha- α -1,3-GlcNAc-disacharid je pomocí fosfodiesterové vazby připojen ke kyselině muramové, která je součástí peptidoglykanové vrstvy (41). Rha- α -1,3-GlcNAc-disacharid lze také označit za spojovací můstek mezi arabinogalaktanovou a peptidoglykanovou vrstvou.

Lineární galaktan a Rha- α -1,3-GlcNAc-disacharid jsou navzájem spojeny β 1,4 vazbami, zatímco jednotlivé jednotky galaktanu jsou mezi sebou střídavě vázány vazbami β 1,5 a β 1,6 a vytváří tak galaktofuran o velikosti přibližně 30 jednotek (42).

Arabinan se skládá ze dvou nebo tří rozvětvených řetězců, které jsou připojeny k lineárnímu galaktanovému řetězci. Každý D-arabinanový řetězec je tvořen 22 Araf jednotkami (43). Základní stavební kostra je tvořena α 1,5-spojenými jednotkami Araf a několika α 1,3-připojenými postranními řetězci (42). Neredukující konce jsou vždy zakončeny β 1,2-Araf jednotkami (β -D-Araf-1,2- α -D-Araf). Jedná se o dimery, na které se váží mykolové kyseliny (44).

Průběh syntézy arabinogalaktanu

Syntéza arabinogalaktanu začíná přenosem GlcNAc-1-fosfátu z UDP-GlcNAc na prenylfosfát za vzniku GlcNAc-P-P-C₅₀ (Obr. 9a). Enzym, katalyzující přenos GlcNAc-1-fosfátu nebyl doposud u *M. tuberculosis* identifikován, nicméně existuje nejméně jeden gen, který je homologický s genem pro GlcNAc-1-fosfotransferasy.



Obrázek 7: Struktura arabinogalaktanové vrstvy. Převzato z Berg a kol., 2007 (44).

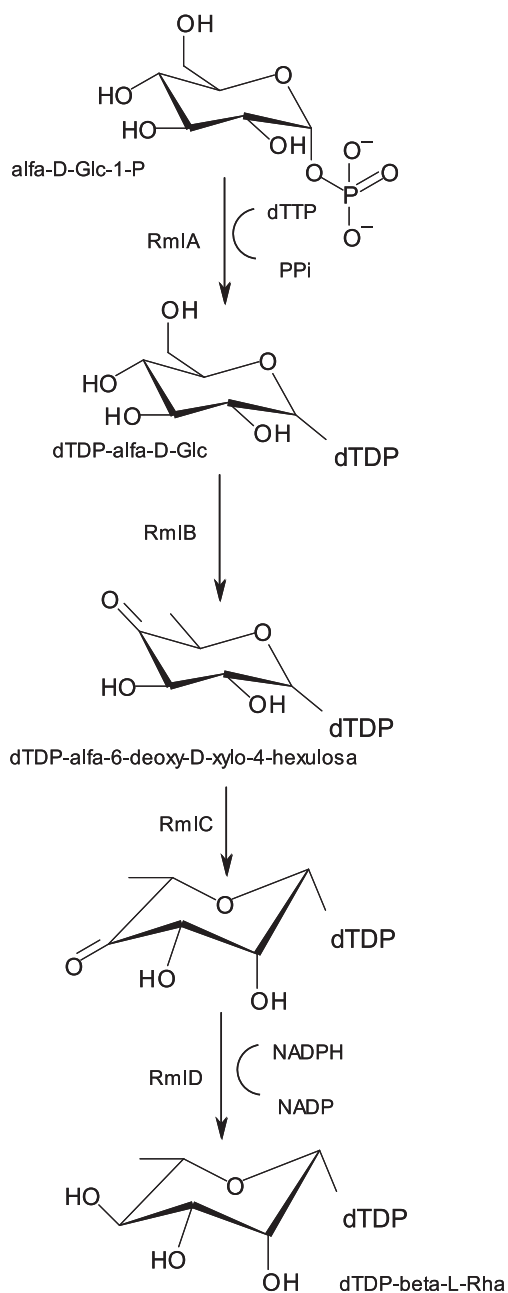
Následuje připojení rhamnosy (Rha) pocházející z dTDP-β-L-rhamnosy. dTDP-β-L-rhamnosa je pomocí enzymu dTDP-rhamnose:prenyldifosforyl-GlcNAc-rhamnosyltransferasy (Wbbl, gen Rv3265c) vázána spolu s prenyl-difosforyl-GlcNAc (GlcNAc-P-P-C₅₀). Vzniká tak Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ (Obr. 9b) (29).

V dalším kroku se k tomuto Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ připojuje galaktofuranosa (galf), která pochází z UDP-galaktofuranosy (UDP-Galf). Reakce je katalyzována enzymem UDP-Galf-transferasou (gen GlfT, Rv3808c). Vzniká tak

místo účinku pro Rhodamin 5372

(Galf)₃₀Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ (Obr. 9c).

K Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ se dále připojuje arabinofuranosa, jejímž donorem je β-D-arabinofuranosyl-1-monofosfodekaprenol (27) a vzniká tak (Araf)₇₀(Galf)₃₀Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ (Obr. 9d) (29). Předpokládá se, že přenosu arabinofuranosy se účastní enzymy arabinosyltransferasy. U *M. tuberculosis* se jedná o tři geny: embC, embA a embB, které tvoří dohromady 10-kb embCAE operon (45), u kmene *M. avium* byly nalezeny arabinosyltransferasy kódovány geny embA a embB (46).

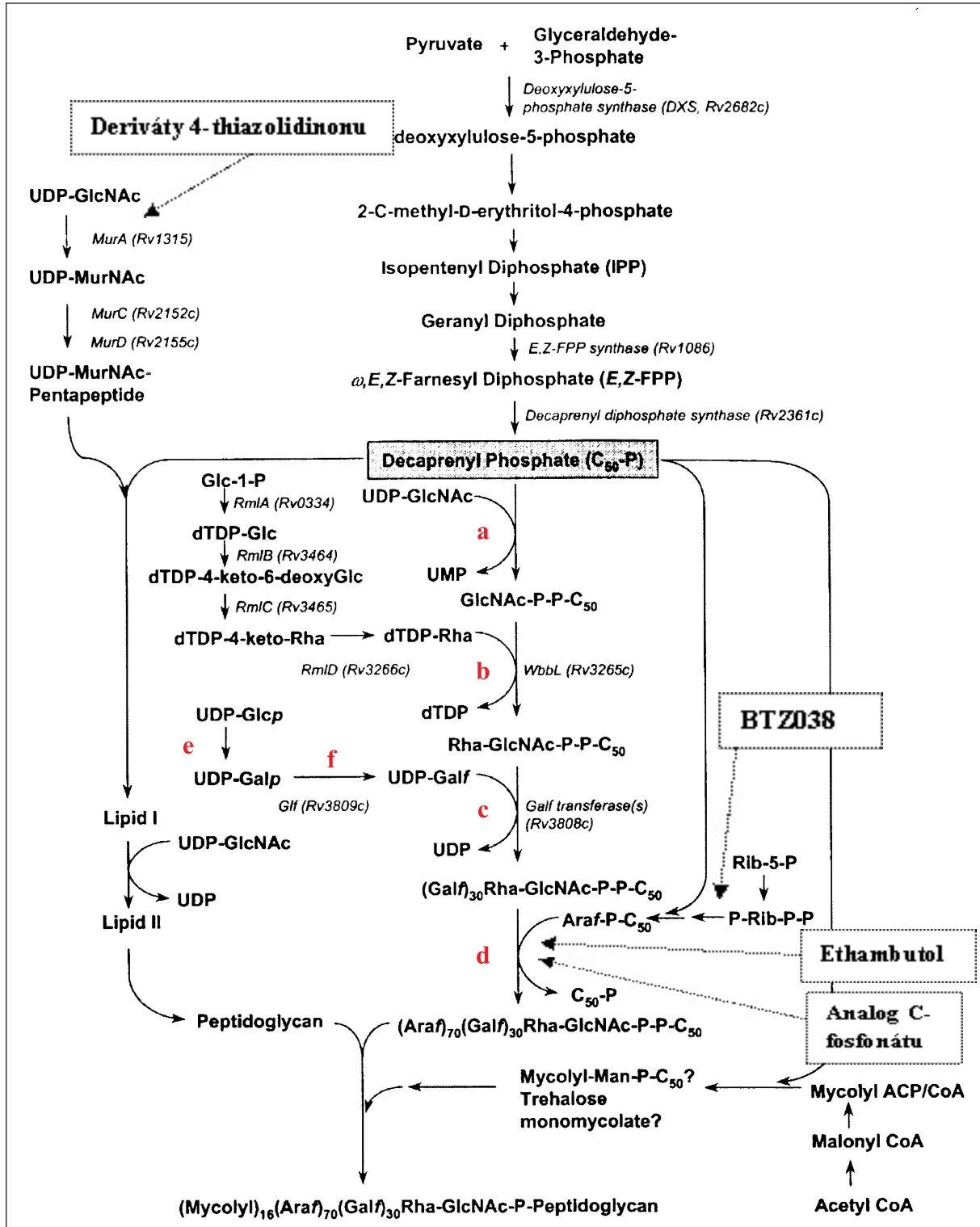


Obrázek 8: Syntéza dTDP-β-L-rhamnosy, cíl působení Rhodaminu 5372. Převzato z Ma a kol., 2001 (24)

Syntéza dTDP-β-L-rhamnosy

Syntéza dTDP-β-L-rhamnosy (Obr. 8) vychází z α-D-glukosa-1-fosfátu, která je pomocí enzymu α-D-glukosa-1-fosfát-thymidylyltransferasy (RmlA, gen Rv0334) přeměněna na dTDP-α-D-glukosu. Následuje dehydratace katalyzovaná enzymem dTDP-D-glukosa-4,6-dehydratasou (RmlB, gen Rv3464) za vzniku dTDP-α-6-deoxy-D-xylo-4-hexulosy. Epimerace této hexulosy katalyzovaná dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glukosa-3,5-epimerasou (RmlC, gen Rv3465)

za vzniku DTP- β -6-deoxy-lyso-4-hexulose. Tato hexulosa je následně působením enzymu dTDP-rhamnosasyntetasy (RmlD, gen Rv3266c) za přítomnosti NADPH přeměněna na dTDP- β -L-rhamnosu.



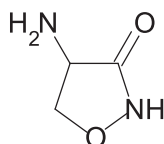
Obrázek 9: Syntéza buněčné stěny a antituberkulotika, která působí na syntézu peptidoglykanové a arabinogalaktanové vrstvy. Převzato a upraveno dle Crick a kol., 2001 (29).

Syntéza UDP-galaktofuranosy

Syntéza UDP-galaktofuranosy (UDP-Galf) začíná přeměnou UDP-glukosy na UDP-galaktopyranosu (UDP-Galp) (Obr. 9e). Tato reakce je katalyzována enzymem UDP-galaktopyranosaepimerasou (gen Rv3634). UDP-galaktopyranosa je poté přeměněna na UDP-galaktofuranosu (UDP-Galf) (Obr. 9f), která je donorem galaktofuranosy připojované k Rha-GlcNAc-P-P-C₅₀ (29).

2.5.1.2. Antituberkulotika působící na úrovni arabinogalaktan-peptidoglykanového komplexu (APc)

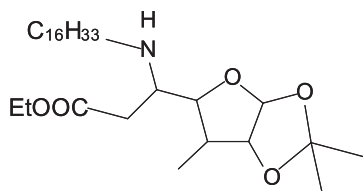
Inhibice syntézy peptidoglykanu



Obrázek 10: Cycloserin

Cykloserin (Obr. 10)

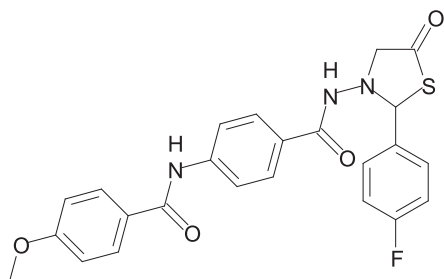
Cykloserin je širokospektré antibiotikum. Jedná se o strukturální analog D-alaninu, který je transportem pro D-alanin dopraven do bakterie. V bakterii pak inhibuje alaninracemasu a alaninligasu, což jsou enzymy podílející se na syntéze peptidoglykanu. Alaninracemasa je enzym podílející se na vzniku D-alaninu z L-alaninu, zatímco alaninligasa umožňuje vznik dipeptidu D-alanyl-D-alanin. Cykloserin působí pouze na rostoucí buňky (38). Kromě cykloserinu inhibují D-alaninracemasu také některé deriváty 5-aminofuranosidu (Obr. 11) a fludalanin (47).



Obrázek 11: Derivát 5-aminofuranosidu

Deriváty 4-thiazolidinonu (Obr. 12)

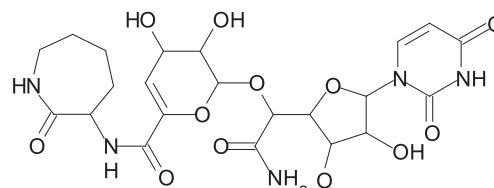
U některých derivátů 4-thiazolidinonu bylo zjištěno, že ovlivňují tvorbu prekurzorů peptidoglykanu tím, že působí jako inhibitory enzymu, který umožňuje přeměnu UDP-N-acetylglukosaminu na kyselinu UDP-N-acetylmuramovou (47).



Obrázek 12: Derivát 4-thiazolidinonu

Tunikamycin, Liposidomycin B, Mureidomycin A, Capuramycin (Obr. 13), Caprazamycin

V současné době se tyto přírodní sloučeniny studují v souvislosti s jejich inhibičním vlivem na růst *M. tuberculosis*. Předpokládá se, že působí jako inhibitory na enzym MurX (48).

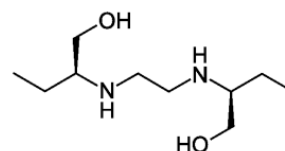


Obrázek 13: Capuramycin

Inhibice syntézy arabinogalaktanu

Ethambutol (Obr. 14)

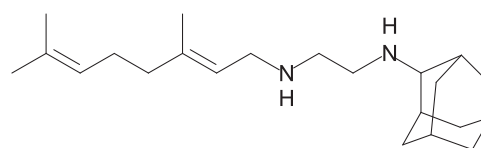
Ethambutol inhibuje arabinosyltransferasu. Jedná se o enzym, který se účastní polymerace D-arabinofuranosy na arabinogalaktan. Rezistence vůči ethambutolu spočívá v mutaci genů, které kódují arabinosyltransferasu. U *M. tuberculosis* se jedná o tři geny: *embC*, *embA* a *embB*, které tvoří dohromady 10-kb *embCAE* operon. U kmene *M. avium* se jedná o geny dva: *embA* a *embB*. Předpokládá se, že rezistence je způsobena především změnami u *embB* (45).



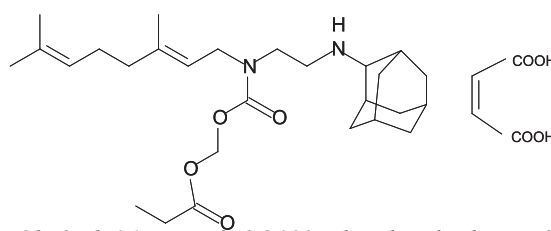
Obrázek 14: Ethambutol

SQ109 (*N*-geranyl-*N'*-(2-adamantyl)ethan-1,2-diamin) (Obr. 15)

Tato sloučenina byla odvozena od ethambutolu s cílem snížit jeho toxicitu. Farmakoforem u SQ109 je tak stejně jako u ethambutolu 1,2-ethylendiamin (49). Sloučenina vstoupila do fáze klinických testů v roce 2005 a v roce 2007 byla dokončena 1a fáze těchto testů. SQ109 vykazuje *in vitro* i *in vivo* aktivitu proti *M. tuberculosis* včetně aktivity proti multirezistentním kmenům. Velikou nevýhodou této sloučeniny je její nízká dostupnost po orálním podání. Studie na mikrosomech lidských jater prokázaly, že při metabolismu SQ109 dochází nejprve k

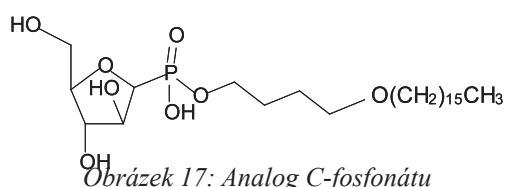


Obrázek 15: SQ109



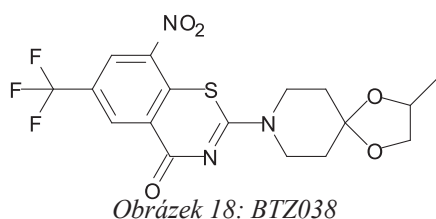
Obrázek 16: Derivát SQ109 a kyseliny karbamové

oxidaci, poté k epoxidaci a *N*-dealkylaci. Aby byla odstraněna tato nevýhoda s dostupností, byla v poslední době vyvinuta některá proléčiva. Např. derivát SQ109 a kyseliny karbamové (Obr. 16) vykazují 91,4% dostupnost po orálním podání ve srovnání s 21,4% dostupností u SQ109 (testováno na krysách). Po orálním podání tohoto proléčiva byla zaznamenána jeho přednostní distribuce do plic a sleziny, což je z hlediska léčby tuberkulózy žádoucí. Derivát SQ109 a kyseliny karbamové spolu s dalšími proléčivy na bázi karbamových kyselin zatím ale nebyly testovány *in vivo* (50). Konkrétní cíl účinku dosud není znám, ví se pouze, že působí na syntézu buněčné stěny. SQ109 má odlišné vlastnosti než ethambutol a předpokládá se, že by se mohlo jednat o zcela nový diamin, a nikoliv pouze o analog ethambutolu. Je také znám synergický účinek SQ109 v kombinaci s isoniazidem a rifampinem (51).



Analog C-fosfonátu (Obr. 17)

Analog C-fosfonátu působí podobně jako ethambutol tak, že inhibuje arabinofuranosyltransferasu (47).



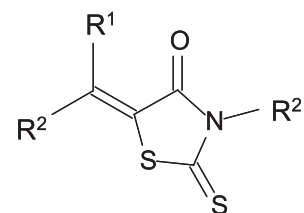
Nitrobenzothiazinon BTZ038 (Obr. 18)

Skupina nitrobenzothiazinonů vykazuje slibné účinky proti mykobakteriím. Derivát BTZ038 byl z této skupiny vybrán k dalšímu testování. Studium vztahu mezi biologickou aktivitou a strukturou prokázaly, že pro aktivitu je nezbytná přítomnost síry a nitroskupiny na pozicích 1 a 8.

Sloučenina obsahuje jedno chirální centrum a oba enantiomery, BTZ043(*S*) a BTZ044(*R*), jsou *in vitro* aktivní. Na základě metabolických studií, které prokázaly, že nitroskupina je v organismu často redukována na aminoskupinu a skutečnosti, že většina antituberkulotik jsou proléčiva, která musí být v organismu aktivována, byly připraveny i *R* a *S* enantiomery aminoderivátu (BTZ045 *S* a *R*) a hydroxylaminoderivát (BTZ046). Tyto deriváty však byly méně aktivní než BTZ038. BTZ038 působí na dekaprenylfosforyl-β-D-ribose-2'-epimerasu, která katalyzuje přeměnu dekaprenylfosforylribosy na dekaprenylfosforylarabinosu čímž působí na syntézu arabinogalaktanové složky buněčné stěny mykobakterií (52).

Derivát rhodaminu 5372 (Obr. 19)

Tento derivát způsobuje inhibici enzymů nezbytných pro syntézu mykobakteriální dTDP-rhamnosy (47), která je významná pro spojení arabinogalaktanu s peptidoglykanem. Inhibuje enzymy RmlA až RmlD, které se podílí na vzniku dTDP-rhamnosy z dTTP a glukosa-1-fosfátu. Výhodou je, že žádný z těchto čtyř enzymů se nevyskytuje u člověka, ačkoliv lze říci, že tvorba UDP-glukosy z α -D-glukosa-1-fosfátu a UTP u člověka je do jisté míry podobná RmlA katalyzované tvorbě dTDP-glukosy u mykobakterií (24).

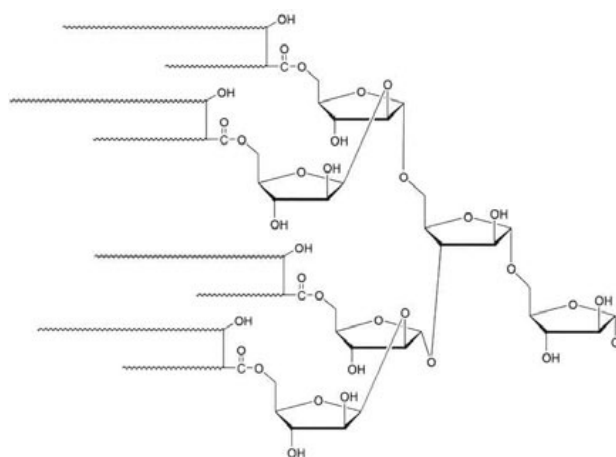


Obrázek 19: 5372

2.5.1.3. Mykolové kyseliny

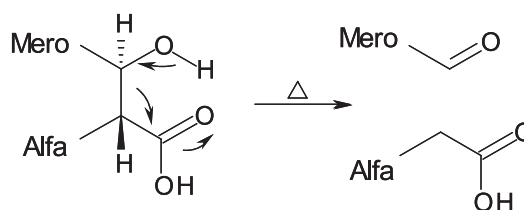
Chemická struktura mykolových kyselin

Mykolové kyseliny jsou vysokomolekulární beta-hydroxy mastné kyseliny s dlouhým α -alkylovým postranním řetězcem, které se vyskytují většinou v tetramykolylpentaarabinosylových klastrech, kde jsou vázány esterovou vazbou (Obr. 20).



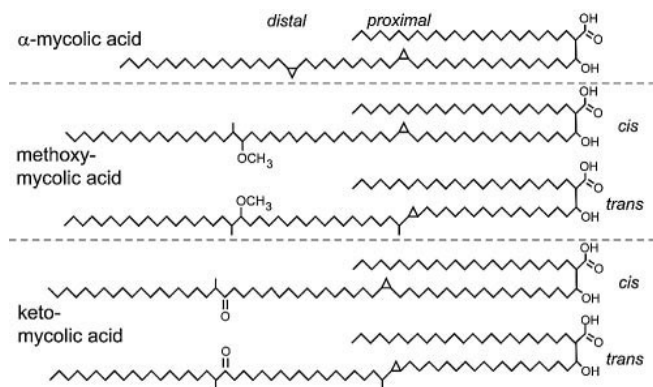
Obrázek 20: Tetramykolylpentaarabinosylové klastry. Převzato z Schroeder a kol., 2002 (26)

Ve struktuře mykolových kyselin lze rozlišit krátký postranní řetězec, který je v α -poloze vzhledem ke karboxylové skupině a dlouhý řetězec meromykolátový, který nese funkční skupiny dle typu mykolové kyseliny. Toto značení vychází z pyrolýzy mykolových kyselin, pomocí níž lze mykolovou kyselinu rozštěpit na meroaldehyd a α -řetězec (Obr. 21) (26). U asymetrických center na C_α a C_β se u většiny mykolových kyselin vyskytuje R,R stereochemie a substituenty na těchto centrech jsou tedy vůči sobě v erythro pozici (53).



Obrázek 21: Pyrolýza mykolových kyselin. Převzato z Schroeder a kol., 2002 (26)

U meromykolátového řetězce mykolových kyselin lze dále rozlišit proximální část a část distální (Obr. 22). Polárnější funkční skupiny lze nalézt spíše na distální části. Může se jednat např. o methoxyskupinu, oxoskupinu, skupinu esterovou nebo epoxid, zatímco na proximální části lze spíše pozorovat nepolární modifikace jako je např. výskyt dvojné vazby



Obrázek 22: Struktura mykolových kyselin. Převzato z Takayama K. a kol. 2005 (43)

nebo cyklopropanového kruhu. Zajímavá je také skutečnost, že v případě, kdy se dvojná vazba a cyklopropanový kruh nalézají v konfiguraci *trans*, tak lze pokaždé v jejich sousedství nalézt methylovou skupinu, zatímco u *cis*-cyklopropanu a *cis*-dvojných vazeb methylovou skupinu v jejich sousedství nepozorujeme (26).

U *M. tuberculosis* lze rozlišit tři základní typy mykolových kyselin (Obr. 22). Jedná se o α -mykolové, methoxy- a keto-mykolové kyseliny (54).

- α -mykolové kyseliny jsou nejvíce zastoupeným typem mykolových kyselin (cca 57%) (26). Z hlediska struktury se jedná o *cis,cis*-dicyklopropyl mastné kyseliny. Vyskytují se ve dvou formách, které se liší v délce terminální alkylové skupiny, v počtu methylenových skupin mezi cyklopropanovými kruhy a karboxylovou skupinou. Např. α -mykolové kyseliny kmenu H37Rv a kmenu klinicky izolovaného jsou odlišné (55).
- Methoxymykolové kyseliny tvoří druhou nejvíce početnou skupinu mykolových kyselin (cca 32%). Ve své struktuře obsahují α -methyl-methyletherovou skupinu v distální pozici a *cis*-cyklopropan a nebo α -methyl, *trans*-cyklopropan v proximální pozici.
- Ketomykolové kyseliny jsou nejméně početnou skupinou (cca 11%) obsahují α -methylketonovou skupinu v distální části molekuly. Funkční skupiny v proximální části molekuly jsou stejné jako u methoxymykolových kyselin (26).

Jelikož se jednotlivé mykolové kyseliny od sebe navzájem liší délkou α - řetězce i řetězce meromykolátového, hovoříme u nich o tzv. heterogenitě. Kromě heterogenity existuje i tzv. mikroheterogenita, což je označení pro skupinu mykolových kyselin, které mají stejný počet atomů uhlíku, ale liší se navzájem pozicí funkčních skupin. Odhaduje se, že pro celkem pět skupin mykolových kyselin existuje přibližně 500 strukturních izomerů (26).

Syntéza mykolových kyselin

Biosyntézu mykolových kyselin můžeme rozdělit do několika následujících kroků, kterými jsou:

- a) *de-novo* biosyntéza mykolových kyselin,

- b) prodlužování řetězce,
- c) modifikace meromykolátu,
- d) Claisenova kondenzace a redukce.

Při syntéze mastných kyselin dochází k narůstání alkylového řetězce o dvouuhlíkové jednotky, které je způsobeno opakováním cyklu čtyř reakcí. První reakcí tohoto reakčního cyklu je kondenzační reakce, při které dochází k dekarboxylaci malonátu a jeho následné kondenzaci s řetězcem mastné kyseliny za vzniku β -oxo-produktu. Tato reakce tak vede k prodloužení řetězce mastné kyseliny o dva atomy uhlíku. V následujících třech reakcích dochází k přeměně vzniklého β -oxo-produktu na jeho alifatickou formu. Nejprve je β -oxoskupina redukována na β -hydroxy-skupinu, následuje dehydratace na enoyl-formu, a tato enoyl-forma je v další reakci redukována. Vzniká tak nasycený alifatický substrát, který v dalším kole podléhá opět kondenzační reakci s dekarboxylovanou molekulou malonátu. Tím dochází opět k nárůstu uhlíkového řetězce o další dva atomy uhlíku a celý reakční cyklus se opakuje až do vzniku mastné kyseliny o potřebné délce.

Na syntéze mastných kyselin mykobakterií se podílí dva typy FAS systému. Jedná se o FAS-I (fatty acid synthase I) a FAS-II (fatty acid synthase II) systém. Oba tyto systémy mají podobnou enzymovou funkci, ale liší se v organizaci. Tyto systémy také vykazují odlišnou substrátovou specifitu a produkují tak mastné kyseliny odlišné délky (56).

FAS-I systém (Obr. 23a)

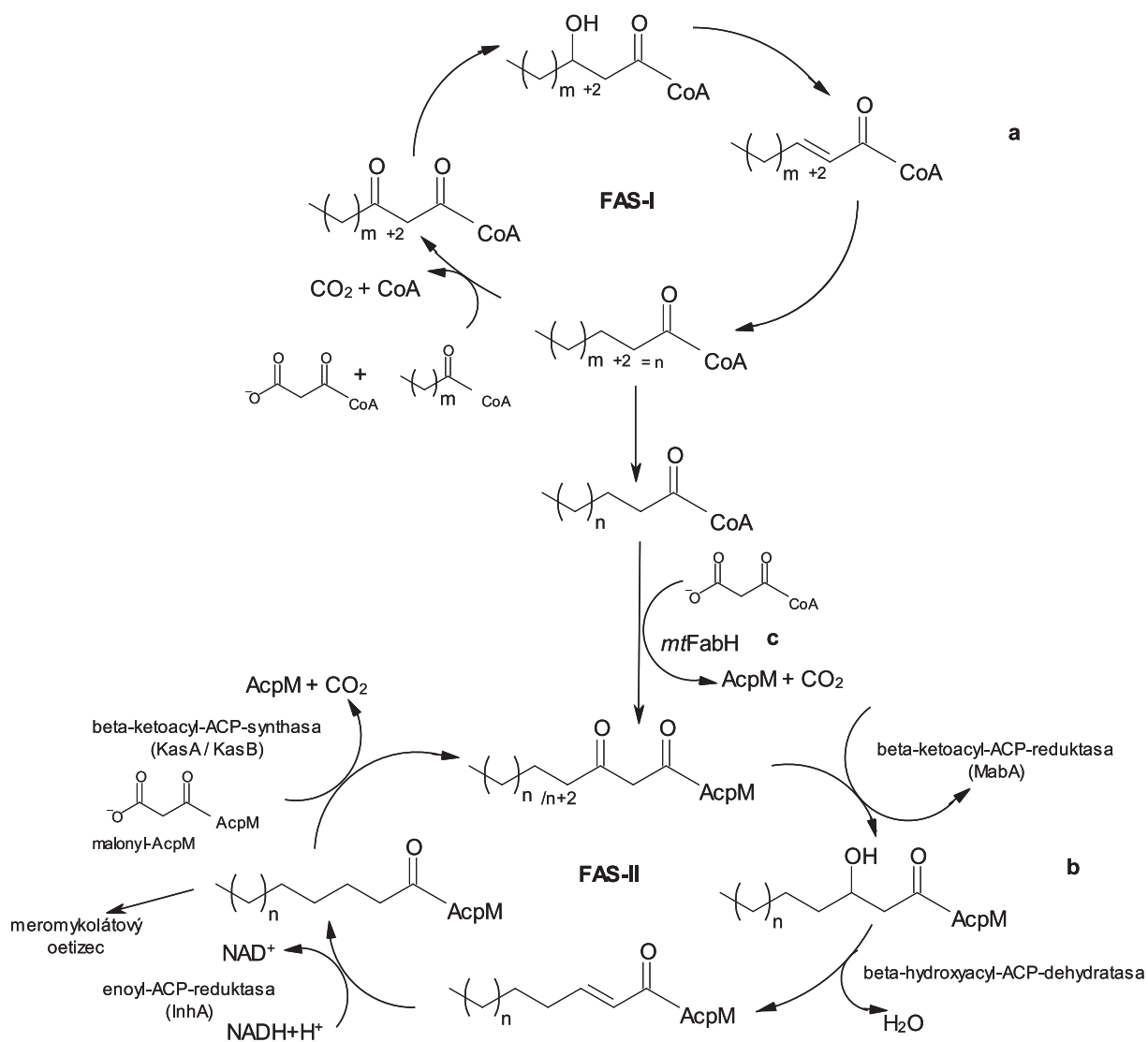
FAS-I systém představuje integrovaný multienzymový systém, který zahrnuje funkci všech enzymů nezbytných pro biosyntézu mastných kyselin v rámci jednoho velkého polypeptidového řetězce. Tento polypeptidový řetězec lze u mykobakterií rozdělit na následující funkční domény: doménu pro acyltransferasu, enoylreduktasu, dehydratasu, malonyl/palmitoyl transferasu, enzym přenášející acyl (acyl carrier protein), β -ketoacylreduktasu a β -ketoacylsynthasu. FAS-I systém je kódován *fas* (*Rv2524c*) genem (54).

FAS-I systém využívá acetyl-CoA a malonyl-CoA jako výchozí substráty pro *de-novo* syntézu C_{14} až C_{16} mastných kyselin (56) a dále také katalyzuje prodloužení těchto mastných kyselin na C_{24} až C_{26} mastné kyseliny (26). C_{14} - C_{16} mastné kyseliny jsou dále prodlouženy enzymem β -ketoacyl-ACP-synthasou III (mtFabH) o dva atomy uhlíku a vstupují do FAS-II systému. Mastné kyseliny C_{24} - C_{26} jsou využívány ve formě CoA a jsou jako substráty využity pro tvorbu α -řetězce (26).

FAS-II systém (Obr. 23b)

FAS-II systém je složen z disociovatelných enzymů (57), které jsou kódovány sérií navzájem oddělených genů (58). Mezi tyto enzymy patří:

- β -ketoacyl-ACP-synthasy (*KasA/ KasB*; *Rv2245/Rv2246*),
- β -ketoacylreduktasa (*MabA*; *Rv1483*),
- β -hydroxyacyl-ACP-dehydratasa (*Rv0098*),
- Enoyl-ACP-reduktasa (*InhA*; *Rv1484*).



Obrázek 23: FAS systémy. Převzato a upraveno dle Schroeder a kol.2002 (26)

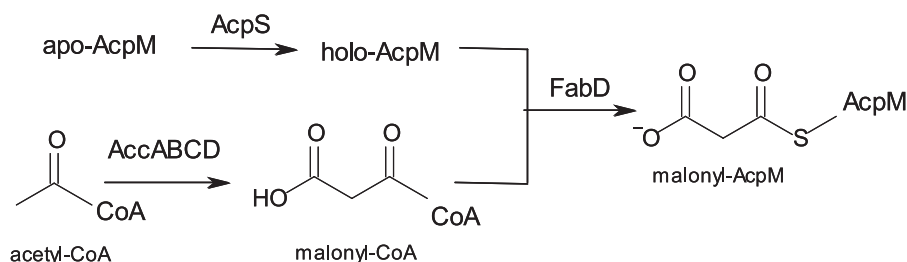
FAS-II systém není schopen de-novo syntézy mastných kyselin, ale slouží k prodloužení C_{16} -acyl-CoA na dlouhé meromykolátové řetězce (C_{54} - C_{62}) (26, 54). Ačkoliv oba enzymy *KasA* a *KasB* katalyzují kondenzaci acyl-ACP s malonyl-ACP a vykazují specifitu pro

acyl-ACP obsahující nejméně šestnáct atomů uhlíků, enzym KasA katalyzuje prodlužovací reakce pouze do C₃₄ (26), zatímco enzym KasB je zodpovědný za dosažení konečné délky meromykolátového řetězce (54).

β-ketoacyl-ACP- synthase III (mtFabH) (Obr. 23c)

Enzym mtFabH (kódován genem *fabH*, *Rv0533c*) spolu s enzymem β-ketoacyl-ACP-synthasou tvoří hlavní spojení mezi posledním cyklem FAS-I a prvním cyklem FAS-II systému. Enzym mtFabH využívá produkty FAS-I systému lauroyl-CoA (C₁₂) a myristoyl-CoA (C₁₄) k vytvoření myristoyl-AcpM (C₁₄) a palmitoyl-AcpM (C₁₆), což jsou substráty pro FAS-II systém. β-ketoacyl-ACP-synthasa A (KasA) poté katalyzuje kondenzaci dvouuhlíkatého malonyl-AcpM s myristoyl- nebo palmitoyl-AcpM.

Tato reakce vyžaduje aktivovaný malonát ve formě malonyl-AcpM. Při této aktivaci (Obr. 24) dochází k transacylaci holo-ACP s malonyl-CoA, která je katalyzována enzymem malonyl-CoA:ACP-transacylasou (mtFabD); (kódována genem *fabD*, *Rv2243*) (57).

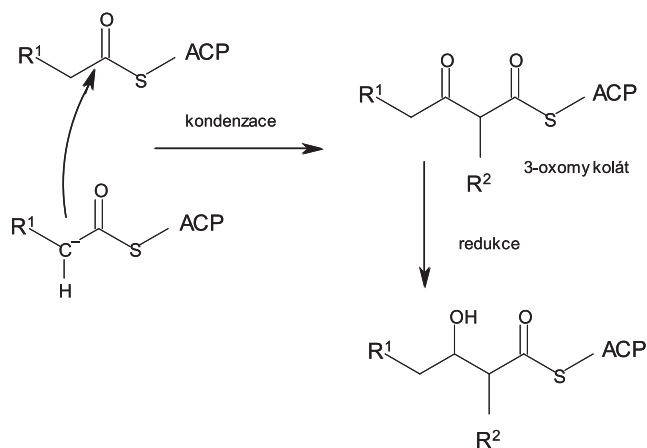


Obrázek 24: Aktivace malonátu. Upraveno dle Bhowruth a kol., 2008 (56)

Modifikace meromykolátu

U řetězce kyseliny meromykolové se jedná o následující modifikace:

- vytvoření dvojných vazeb (enzymy desaturasy: *desA1*, *desA2*, *desA3*),
- tvorba cyklopropanových kruhů (enzymy cyklopropan mycolic acid synthasy: *cma1*, *cma2* a *pcaA*),
- přenos methylové skupiny (enzymy methyltransferasy: *mma1* až *mma4*)
- oxidační reakce (málo prozkoumány, pravděpodobně enzym alkoholdehydrogenasa katalyzující přeměnu hydroxylové skupiny na oxoskupinu) (56).

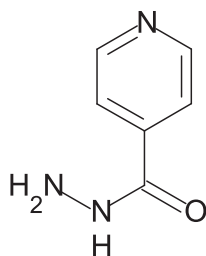


Obrázek 25: Claisenova kondenzace a redukce 3-oxomykolátu na mykolát.

Claisenova kondenzace

Claisenova kondenzace (Obr. 25) mezi meromykolátovým a α -řetězcem a po ní následující redukce jsou posledními kroky při biosyntéze mykolových kyselin. Při Claisenově kondenzaci dochází interakci aktivovaného C_{56} -meromykolátového řetězce s aktivovaným C_{26} - α -řetězcem za vzniku 3-oxomykolátu jako meziproduktu. Tento 3-oxomykolát je následně redukován na mykolát (26).

2.5.1.4. Antituberkulotika působící na úrovni mykolových kyselin



Obrázek 26: INH

Isoniazid (INH, hydrazid kyseliny isonikotinové) (Obr. 26)

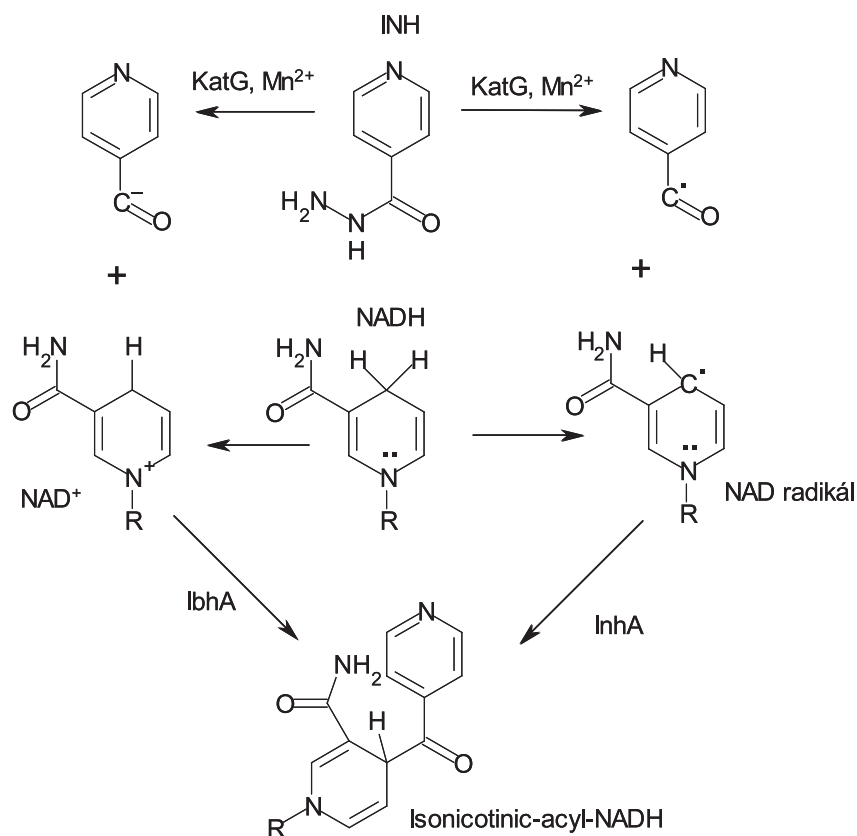
Isoniazid patří k nejstarším synteticky připraveným antituberkulotikům. Jedná se o sloučeninu silně hydrofilní, která do buněk proniká póry v buněčné stěně. Účinek INH vyžaduje nejprve aktivaci pomocí mykobakteriální peroxidasy KatG. Aktivací vzniká nestabilní meziprodukt, který podléhá reakci s NAD^+/NAD^{\cdot} (Obr. 27). Vzniklý komplex isonicotinic-acyl-NADH se váže na aktivní místo

pro NAD(H) u enzymu enoyl-ACP-reduktasy (InhA) čímž tento enzym inhibuje (59).

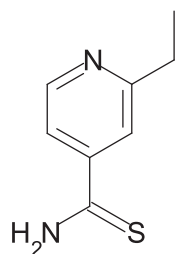
Předpokládá se, že komplex isoniazidu s NADH je zodpovědný i za inhibici dalších enzymů vyžadujících přítomnost NADH. Jedná se např. o enzym MabA (48, 60) a dihydrofolátreduktasu (48).

Ethionamid, (ETH), prothionamid (PTH) (Obr. 28, 29)

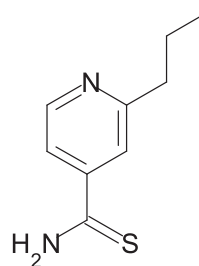
Mezi těmito třemi léčivy byla nalezena zkřížená rezistence u kmenů *M. leprae* a *M. tuberculosis* (48). Ačkoliv tato léčiva podobně jako INH působí na úrovni InhA, existuje zde určitý rozdíl v aktivačním mechanismu. Na aktivaci ETH a PTH se na rozdíl od INH podílí flavoprotein monooxygenasa EthA (Obr 30). Předpokládá se vznik buď imidoyl-radikálu nebo



Obrázek 27: Předpokládaný mechanismus aktivace INH. Upraveno dle Rozwarski a kol., 1998 (59)



Obrázek 28: Ethionamid

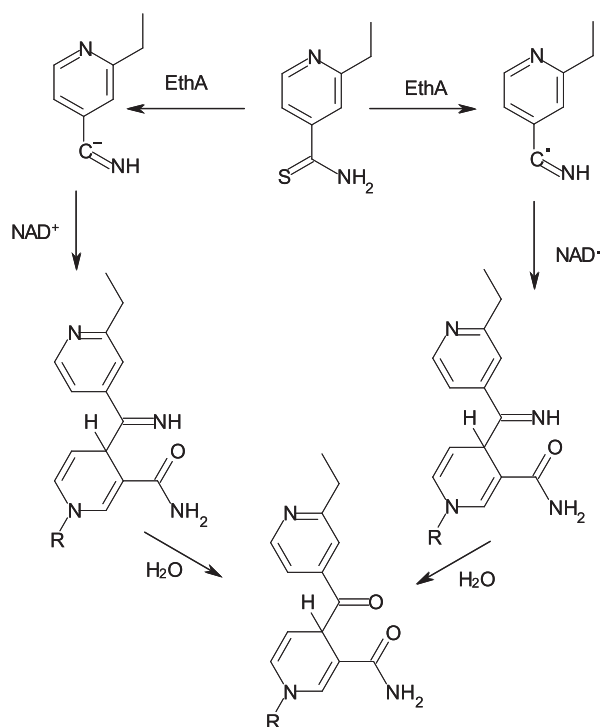


Obrázek 29: Prothionamid

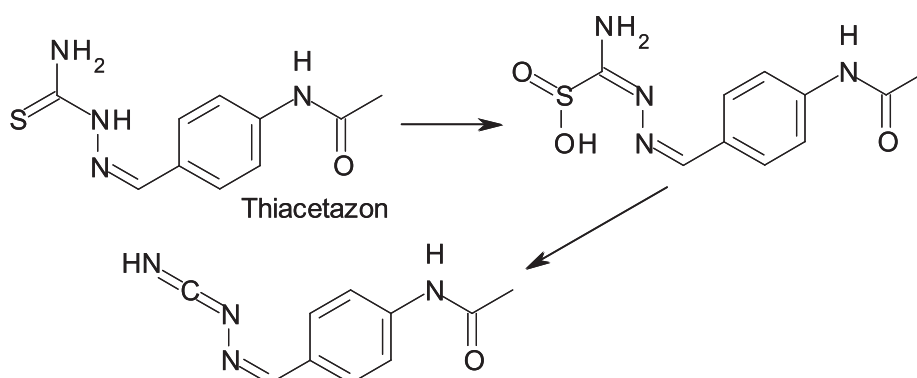
imidoyl-aniontu a jejich následná interakce s NAD⁺ / NAD[•] následovaná hydrolyzou za vzniku komplexu ethyl-/prothyl-isonicotinic-acyl-NAD. Doposud ale nebylo zjištěno, zda se této přeměny účastní pouze enzym EthA nebo i jiné enzymy (61).

Thiacetazon

Thiacetazon také vykazuje zkříženou rezistenci s ETH a PTH, působí rovněž na úrovni InhA a na aktivaci se podílí enzym EthA. Pravděpodobným produktem aktivace je karbodiimid (Obr. 31) (48). Existuje i studie, podle které thiacetazon inhibuje tvorbu cyklopropanových kruhů u mykolových kyselin (62).

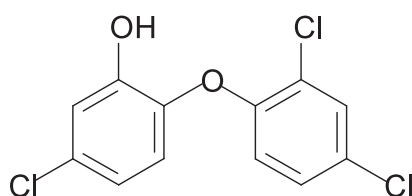


Obrázek 30: Pravděpodobná aktivace ETH a PTH. Převzato a upraveno dle Wang a kol., 2007 (61).



Obrázek 31: Pravděpodobná aktivace thiacetazonu. Převzato a upraveno dle Janin, 2007 (48)

Triklosan (Obr. 32)

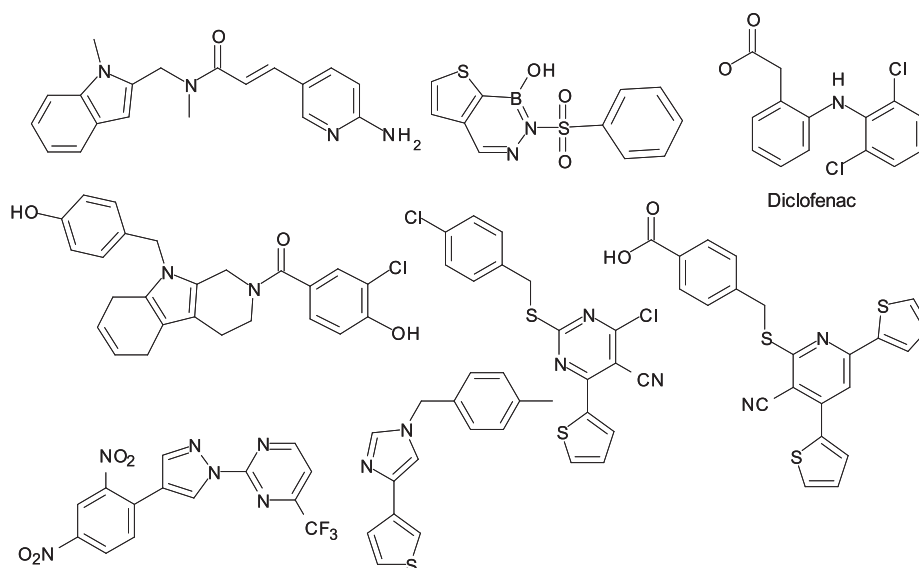


Obrázek 32: Triklosan

Triklosan byl původně patentován jako herbicid, ale brzy bylo zjištěno široké spektrum jeho účinku. Pro svoji nízkou toxicitu začal být používán jako antiseptikum, a to jak v laboratořích, nemocnicích, tak i v domácnostech. Byl přidáván do zubních past, ústních vod, deodorantů a mýdel. Triklosan nepůsobí sice jako antibiotikum, ale má antiseptické a dezinfekční účinky (26). Dříve se předpokládalo, že triklosan jako malá hydrofobní molekula

difunduje do buněčné stěny bakterie a že jeho biologická aktivita spočívá v disrupci této buněčné stěny. Teprve nedávno bylo zjištěno, že jeho mechanismus spočívá v inhibici InhA (63).

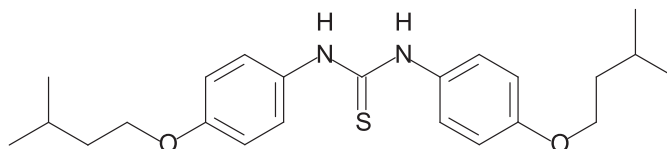
Další sloučeniny, u kterých se předpokládá účinek na úrovni InhA (Obr. 33)



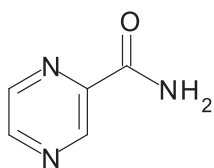
Obrázek 33: Sloučeniny, u kterých se předpokládá působení na InhA (48)

Isoxyl (Thiokarlid, 4,4'- diisoamyldifenyylthiourea) (Obr. 34)

Isoxyl představuje další sloučeninu obsahující thiokarbonylovou skupinu, která byla používána v klinické praxi. Nevýhodou je jeho zkřížená rezistence s ETH a thiacetazonem. Předpokládá se, že je podobně jako tato dvě léčiva aktivován pomocí enzymu EthA (48). Isoxyl kromě toho, že působí na syntézu mykolových kyselin inhibuje $\Delta 9$ -stearoylidesaturasu (48, 64).



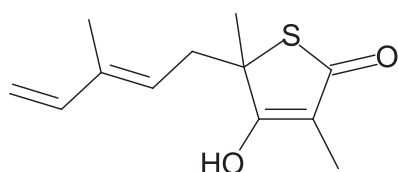
Obrázek 34: Isoxyl



Obrázek 35: Pyrazinamid

Pyrazinamid (PZA) (Obr. 35)

Pyrazinamid vykazuje silně synergický a akcelerační účinek v kombinaci s isoniazidem a rifampicinem. Aktivní formou je kyselina pyrazinkarboxylová, která vzniká hydrolyzou pyrazinamidu pomocí mykobakteriální pyrazinamidasy. To, že kyselina pyrazinkarboxylová je onou aktivní formou, potvrzuje i skutečnost, že tato kyselina je účinná in vivo i proti pyrazinamid- a nikotinamid-rezistentním kmenům *M. tuberculosis*, u kterých chybí aktivita pyrazinamidasy (26). Cíl účinku PZA je stále předmětem výzkumu, předpokládá se ale, že by se mohlo jednat o působení na FAS-I systém (48).



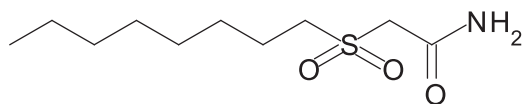
Obrázek 36: Thiolaktomycin

Thiolaktomycin (TLM) (Obr. 36)

Jedná se o thiolaktonové antibiotikum produkované jako sekundární metabolit houbovým organismem *Nocardia sp.* TLM patří do skupiny thiolaktonových antibiotik.

TLM inhibuje kondenzační enzymy FabH, KasA a KasB (48). Problémy se syntézou a nízká stabilita thiolaktomycinu zatím nedovolují jeho rozšíření jako léčiva. Nicméně pro své další vlastnosti zůstává stále zajímavým antibiotikem. Výhodou je zejména žádná nebo velmi nízká zkřížená rezistence s ostatními antibiotiky, což umožňuje jeho použití i proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis* (26).

N-oktansulfonylacetamid (OSA) (Obr. 37)

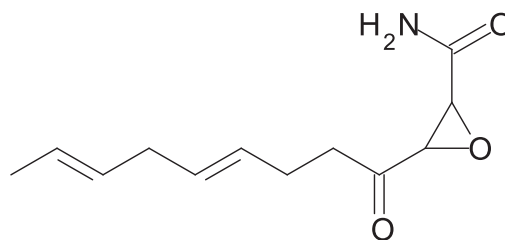


Obrázek 37: N-oktansulfonylacetamid

Bylo zjištěno, že *N*-oktansulfonylacetamid působí proti různým druhům mykobakterií včetně *M. tuberculosis*. Výhodou této sloučeniny je absence zkřížené rezistence vůči isoniazidu, rifampicinu, ethambutolu, streptomycinu a pyrazinamidu. Přesný cíl působení není dosud znám, uvažuje se o FAS-II systému (26).

Cerulenin (Obr. 38)

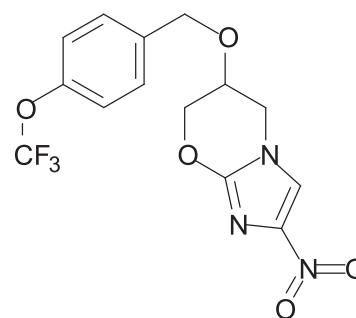
Cerulenin byl izolován z kultury houbového organismu *Cephalosporium caerulens*. Ukázalo se, že inhibuje růst mnoha druhů mykobakterií, včetně *M. tuberculosis*, *M. bovis* a multirezistentních kmenů *M. tuberculosis*. Výhodou je opět absence zkřížené rezistence s rifampicinem, ethambutolem, streptomycinem, pyrazinamidem a isoniazidem, což nasvědčuje tomu, že patří mezi sloučeniny s jiným mechanismem účinku než mají tato léčiva. Zkoumání vlivu ceruleninu na *M. bovis* prokázalo, že dochází k inhibici mykolových kyselin a předpokládá se inhibice mykobakteriálního FAS-I i FAS-II systému. Nevýhodou ceruleninu je jeho nízká stabilita v lidském organismu (26).



Obrázek 38: Cerulenin

PA-824 (NAP) (Obr. 39)

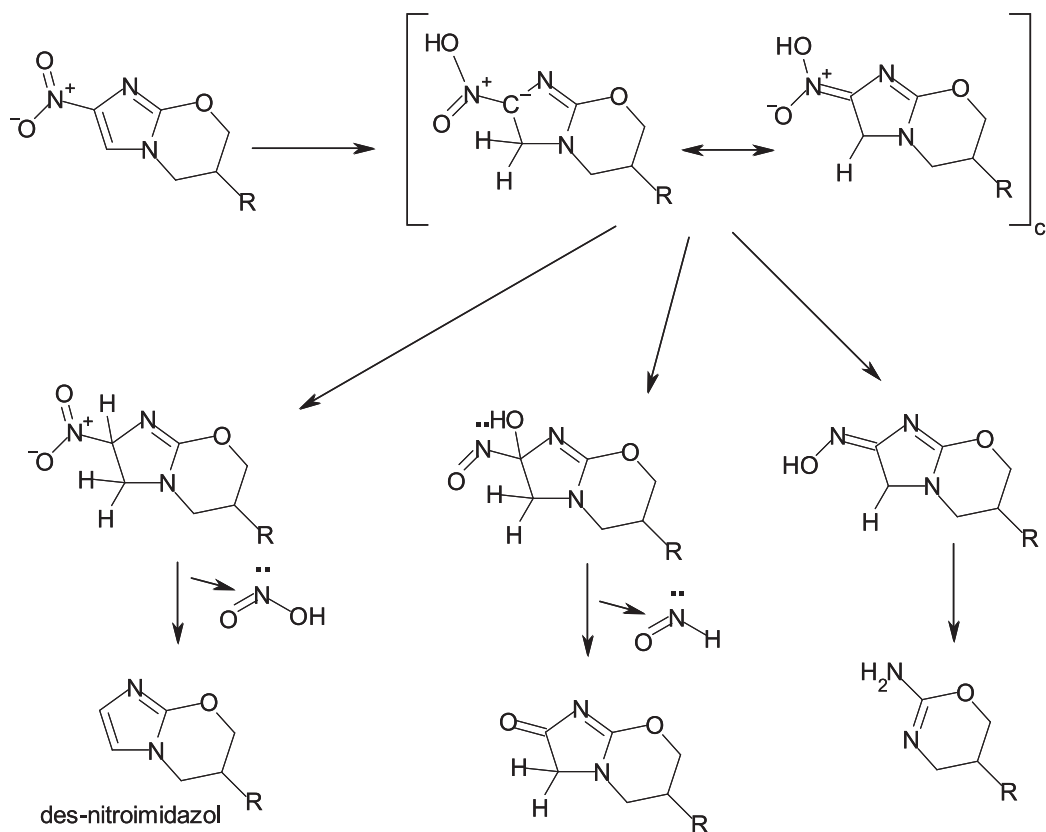
Tento nitroimidazopyran vykazuje vysoce specifickou aktivitu proti komplexu *M. tuberculosis*. Předpokládá se, že zabraňuje oxidaci hydroxymykolátu na ketomykolát, který se vyskytuje v buněčné stěně mykobakterií (47). Vzhledem ale k tomu, že NAP působí i na bakterie nacházející se v nereplikující fázi (neprobíhá u nich tedy intenzivní syntéza mykolových kyselin), lze předpokládat, že mechanismus účinku NAP je komplexnější. Bylo zjištěno, že pro účinek NAP je nutná nejprve jeho aktivace pomocí deazaflavin-dependentní nitroreduktasy (Ddn), která přeměňuje NAP na tři primární metabolity. Jedním z těchto metabolitů je des-nitroimidazol. Mezi tímto des-nitroimidazolem a bakteriální smrtí za anaerobních podmínek byla nalezena významná korelace. Pravděpodobnou příčinou účinku je intracelulární uvolnění reaktivních dusíkatých sloučenin (Obr. 40) (65). Významná je také skutečnost, že NAP je aktivní i proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis* (26).



Obrázek 39: PA-824

OPC-67683 (Obr. 41)

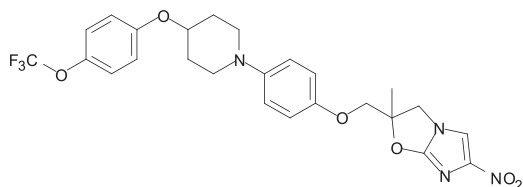
Tato sloučenina nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními antituberkulotiky. Působí pravděpodobně podobně jako NAP na úrovni syntézy hydroxy- a ketomykolových kyselin (26). Předpokládá se podobná aktivace a účinek jako u NAP (48).



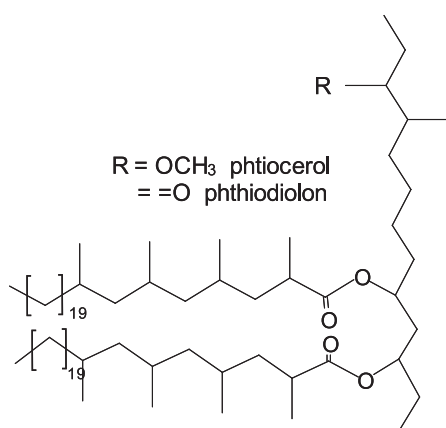
Obrázek 40: Aktivace NAP. Převzato a upraveno dle Singh a kol., 2008 (65)

2.5.1.5. PKS systémy (Polyketidesynthases)

PKS se společně s FAS systémy účastní syntézy mykobakteriálních lipidů. Zatímco FAS systémy katalyzují biosyntézu mastných kyselin, PKS obvykle produkují sekundární metabolity (66). Jsou tak producenty různých exotických mykobakteriálních lipidů (67). Mimo jiné se jedná zejména o syntézu esterů phthiocerol a phthiodiolon dimykocerosátu (PDIMs) (Obr. 42) (68), syntézu sulfolipidu I (SL-I) (Obr. 43) (69) a mykobaktinu (67).



Obrázek 41: OPC-67683



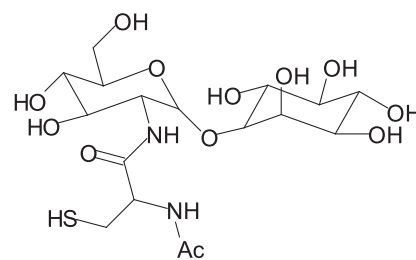
Obrázek 42: PDIM

PDIMs jsou periferní lipidy mykobakteriální buněčné stěny, které jsou produkovány a ve velkém počtu transportovány do infikovaných makrofágů. PDIMs jsou následně včleněny do buněčné

membrány a transportovány dovnitř do buňky hostitele (70). SL-I a mykobaktin také souvisí s mykobakteriální virulencí (69, 67).

PKS se skládají ze tří základních katalytických domén. Jedná se o acyltransferasu, ketosynthasu a acyl přenášející protein (acyl carrier protein). U mykobakterií se rozlišují celkem tři PKS systémy: PKS I, II a III (67).

Předpokládá se, že jelikož existuje podobnost mezi PKS a FAS, mohou sloučeniny inhibující FAS sloužit i jako inhibitory PKS (67).



Obrázek 43: SL-I

Siderofor

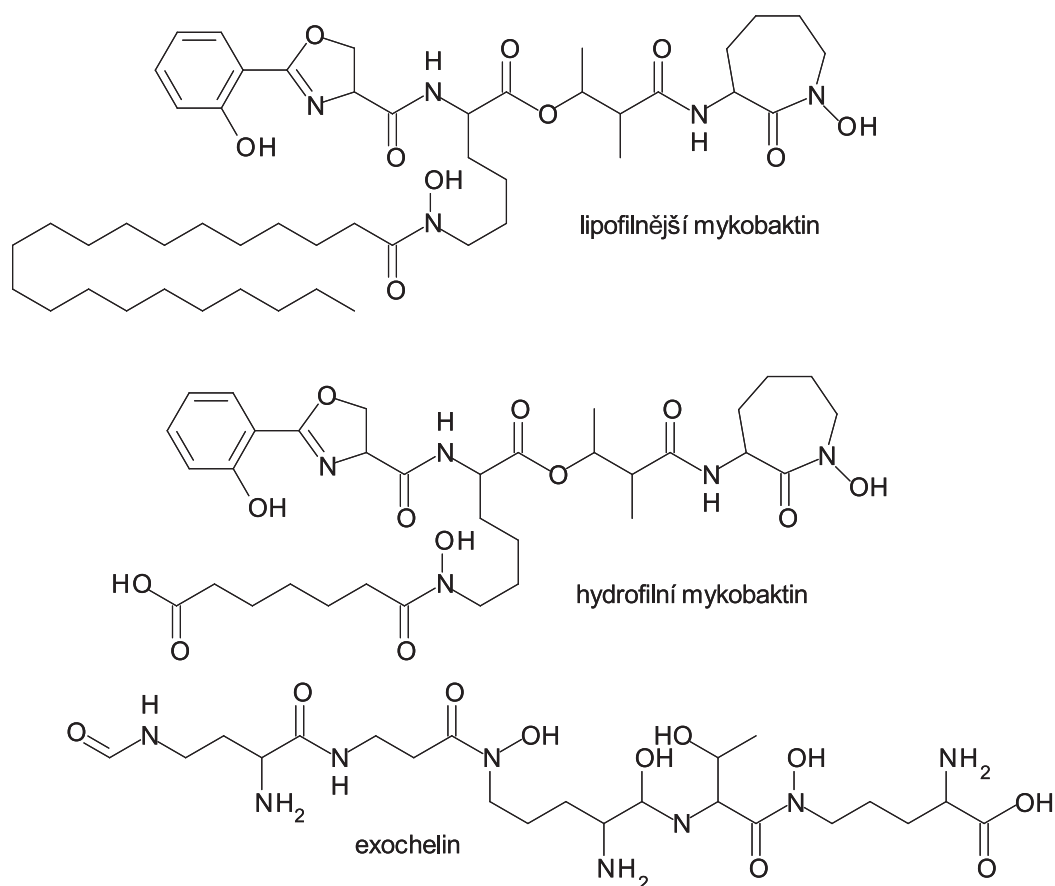
Železo je obligátním kofaktorem nejméně pro 40 různých enzymů *M. tuberculosis*. Železo je nezbytné pro správnou funkci cytochromů a dalších hemoproteinů, mezi nimi například i pro katalasu-peroxidasu KatG. Většina železa je u mykobakterií v nehemové podobě, většinou ve formě klastrů se sírou, kde slouží jako kofaktory řady enzymů. Železo je také limitujícím prvkem pro růst mykobakterií (71).

Mykobakterie v makrofázích hostitelského organismu získávají železo pomocí vysoce afinitního transportního mechanismu, který je zprostředkován pomocí sideroforů. Syntéza těchto sideroforů je regulována koncentrací iontů železa v okolním prostředí (71).

U mykobakterií se vyskytují čtyři typy sideroforu. Nejjednoduššími jsou kyselina salicylová a kyselina citronová (71). Dále lze rozlišit dva komplexnější typy sideroforů. Jedná se o mykobaktin obsahující fenyloxazolidinový cyklus a exochelin, který tento cyklus neobsahuje. Mykobaktiny a exocheliny vykazují vysokou afinitu vůči železu. Mykobaktin lze dále rozlišit na hydrofilní a lipofilnější mykobaktin s předpokladem, že hrají při získávání železa z okolního prostředí různé biologické role (Obr. 44) (72).

Mykobaktin se skládá z hydroxyfenyloxazolinového cyklu, který je vázán na ϵ -aminohydroxylovaný a acylovaný lysin. Ke karboxylové skupině tohoto lysinu je esterovou vazbou vázán β -hydroxybutyrát, který je dále kovalentně vázán ke druhému *N*-hydroxylovanému cyklizovanému lysinu (67).

Na syntéze mykobaktinu (Obr. 45) se účastní systémy PKS a NRPS (neribozomální peptidsynthasa). Biosyntéza mykobaktinu je iniciována salicylyl-AMP-ligasou (MbtA), neribozomální peptidsynthasa (MbtB) zabudovává serin nebo threonin za současné cyklizace na oxazolinový cyklus. MbtB využívá k tvorbě peptidů z aminokyselin mechanismus na bázi



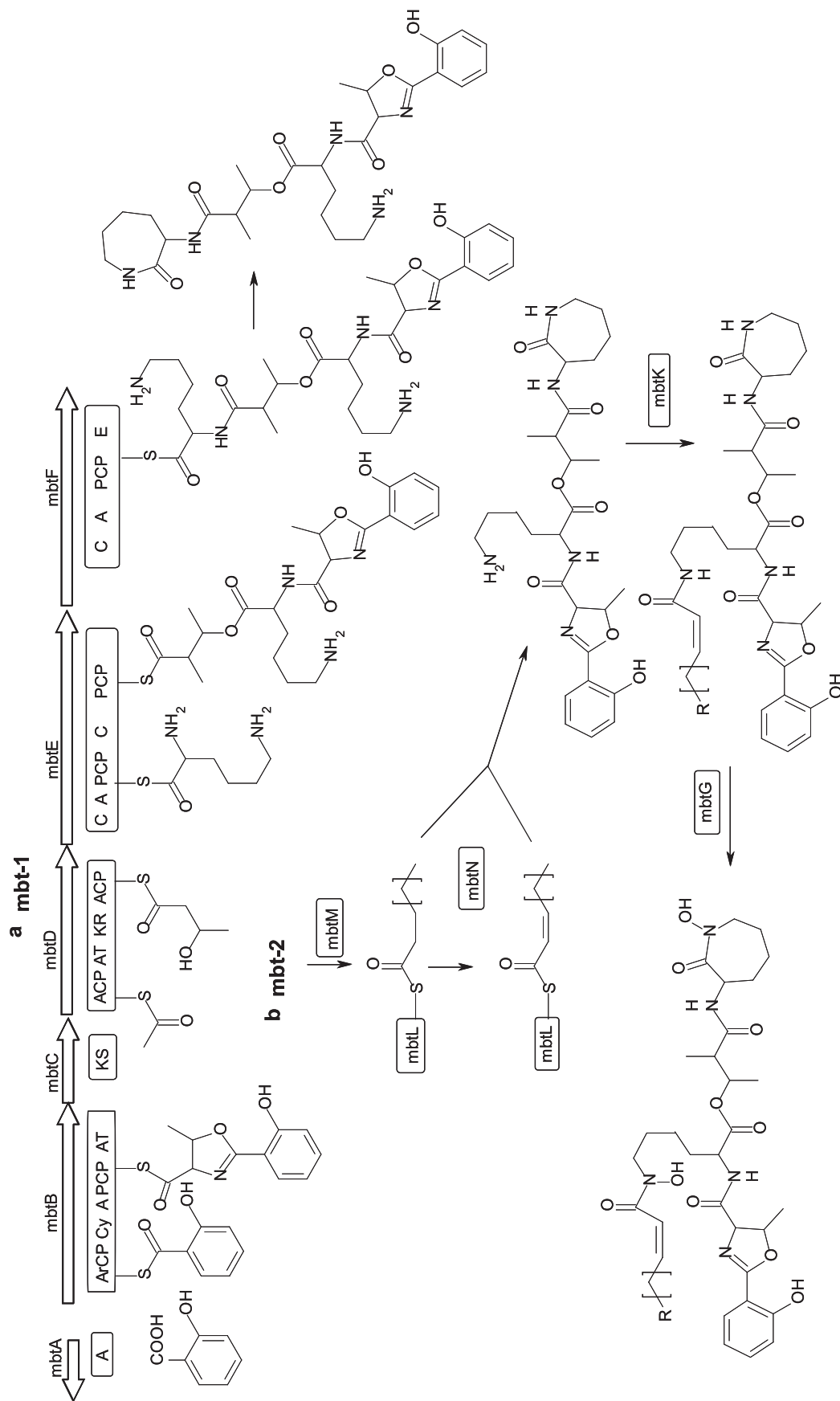
Obrázek 44: Siderofory (71, 72)

thiotemplátu. MbtE a MbtF připojují dvě molekuly lysinu. MbtC a MbtD využívají jednotky acetyl a malonyl-CoA k vytvoření β -hydroxybutyrátu mezi dvěma lysiny. MbtJ cyklizuje C-koncový *N*-hydroxylovaný lysin na sedmičlenný laktamový cyklus (67).

Mezi enzymy, které se podílí na modifikacích ϵ -aminoskupiny centrálního lysinu patří *N*-acyltransferasa (MbtK), acyl-carrier protein (MbtL), acyl-AMP-ligasa (MbtM) a acyl-CoA dehydrogenasa (MbtN). MbtM nejprve aktivuje mastné kyseliny, které jsou navázané na MbtL za vzniku acyladenylátu. MbtK zajistí jejich přenos na volnou ϵ -aminoskupinu. Následně MbtN katalyzuje vytvoření dvojné vazby a za účasti MbtG vzniká nakonec hydroxamátová skupina (67).

Celé syntézy se účastní dva genetické klastry: *mbt1* a *mbt2*. Oba tyto klastry jsou regulovány pomocí irondependentního represoru (IdeR). Klastř *mbt1* je zodpovědný za vznik základu molekuly mykobaktinu a *mbt2* pak za následné modifikace základní molekuly (67).

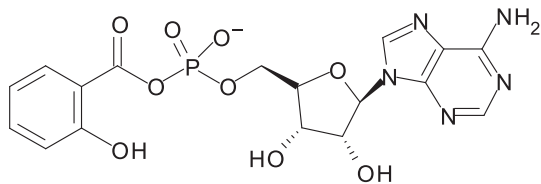
Předpokládá se, že siderofory jsou pomocí speciálních receptorů a přenašečů transportovány napříč cytoplasmatickou membránou (71).



Obrázek 45: Syntéza mykobaktinu. Převzato a upraveno dle Parish, Brown, 2009 (67)

2.5.1.6. Inhibitory sideroforů

Inhibice syntézy sideroforů vede k zastavení bakteriálního růstu a virulence v prostředí, ve kterém je nedostatek železa. Takovéto prostředí se nachází v hostitelském organismu.



Obrázek 46: Salicylsulfamoyladenosin (73)

Salicylsulfamoyladenosin (Obr. 46)

Tato sloučenina je prvním biochemicky potvrzeným inhibitorem syntézy sideroforu. V prostředí s nedostatkem železa inhibuje růst *M. tuberculosis* (73).

2.5.2. Syntéza leucinu, isoleucinu a valinu

Na syntéze aminokyselin s rozvětveným řetězcem, tj. leucinu, isoleucinu a valinu se podílejí enzymy acetolaktátsynthasa (ALS), ketolacidreduktoisomerasa (KARI) a dihydroxyaciddehydratasa (DHAD). Syntézy leucinu se navíc účastní i enzymy isopropylmalátsynthasa (IPMS), isopropylmalátisomerasa (IPMI) a isopropylmalátdehydrogenasa (IPMD). U *M. tuberculosis* ale byly nalezeny ještě další dva enzymy – acetohydroxyacidisomerasa a 2-keto-3-hydroxyacidreduktasa, které společně nahrazují činnost KARI. Jelikož se u *M. tuberculosis* vyskytují jak tyto dva enzymy, tak i enzym KARI, lze předpokládat existenci dvou alternativních cest (Obr. 47) (74).

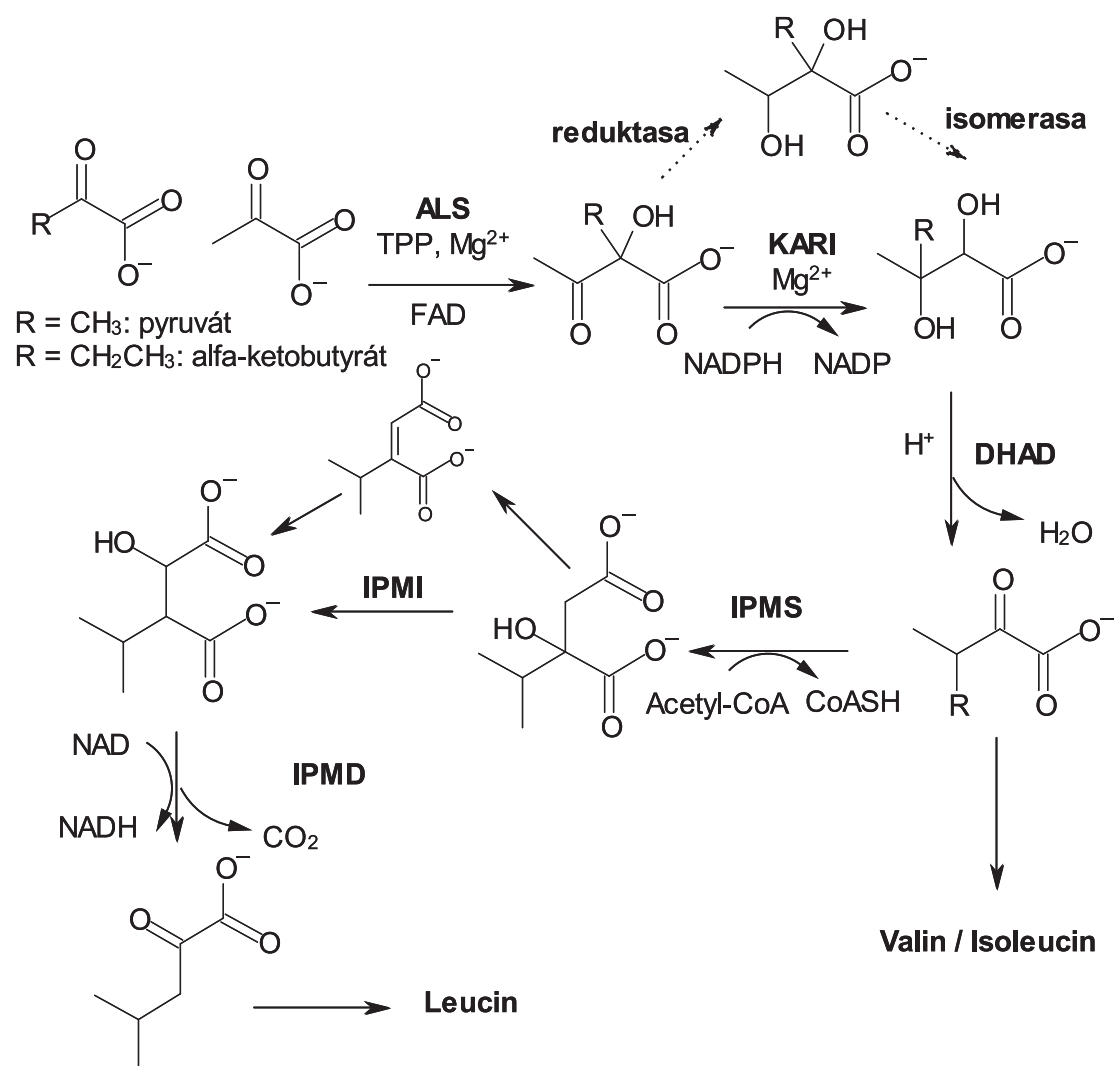
2.5.2.1. Inhibitory syntézy aminokyselin s rozvětveným řetězcem

Sulfometuronmethyl a metsulfuronmethyl (Obr. 48)

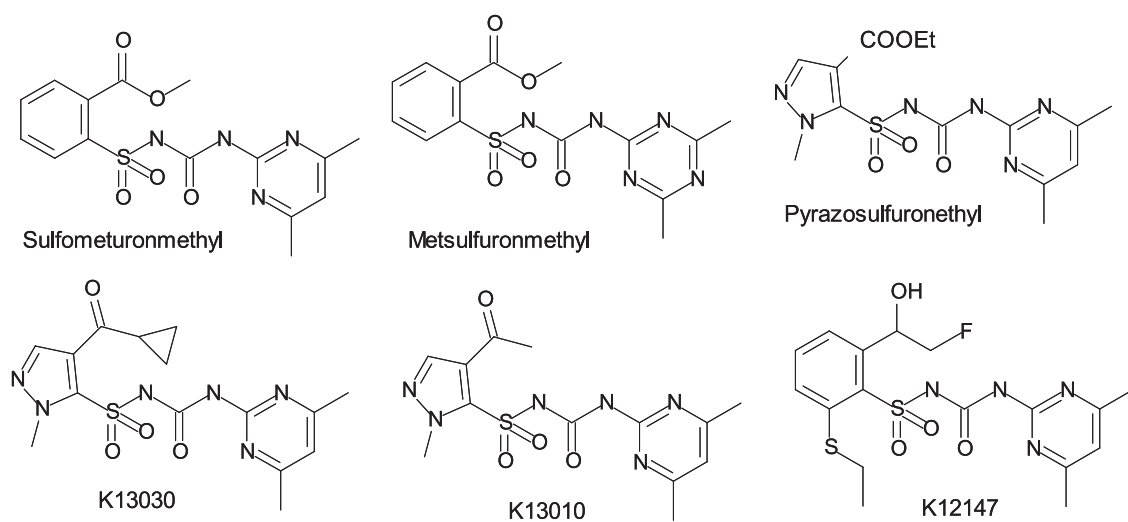
Tyto sloučeniny patří mezi herbicidy inhibující acetolaktátsynthasu. Na základě scenuingu chemických databází byly nalezeny další sloučeniny působící na tento enzym. Jedná se např. o pyrazosulfuronethyl. Další sloučeniny, jako např. K13030, K13010 a K12147 byly nově připraveny (Obr. 48). Sloučenina K13030 byla nejvíce aktivní při testování na kmeny *M. tuberculosis* H37Rv, INH rezistentní *M. tuberculosis*, RIF-rezistentní *M. tuberculosis* a MDR-rezistentní *M. tuberculosis* a vykazovala účinek i na *M. kansasii* (75).

2.5.3. Syntéza cysteinu

Thiolová skupina aminokyseliny cysteinu se v mykobakteriální buňce účastní celé řady metabolických procesů. Ovlivňuje redoxní pochody i strukturu proteinů, účastní se celé řady katalytických procesů i procesů spojených s příjmem kovů. U *M. tuberculosis* probíhá



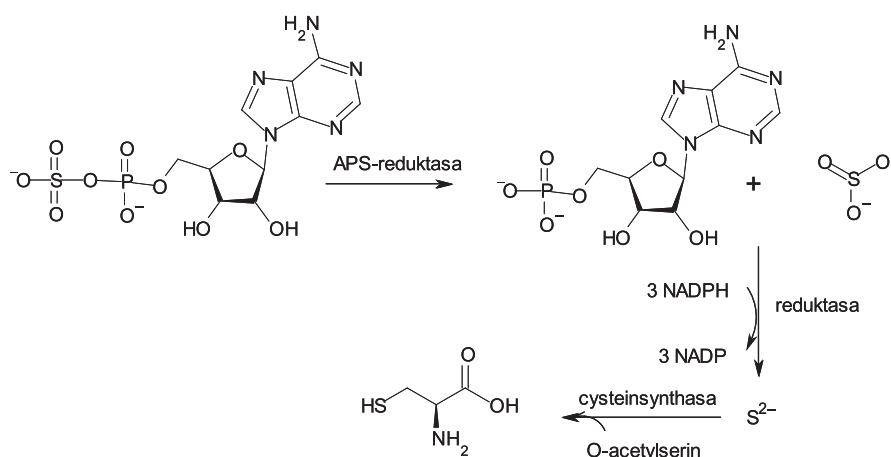
Obrázek 47: Syntéza leucinu, valinu a isoleucinu



Obrázek 48: Inhibitory ALS (75)

aktivace anorganické síry potřebné pro syntézu cysteinu přes adenosin-5'-fosfosulfát. Tento makroergický meziprodukt vzniká interakcí ATP-sulfurylasy se sulfátem a ATP.

Enzym APS-reduktasa katalyzuje první krok v redukci sulfátu. Tento enzym představuje ideální cíl pro antituberkulotika. Jedná se o totiž o enzym, který je nezbytný pro přežití mykobakterie zejména v případě latentní fáze tuberkulózy. Metabolická cesta vedoucí ke vzniku cysteinu je popsána na obr. 49 (76).



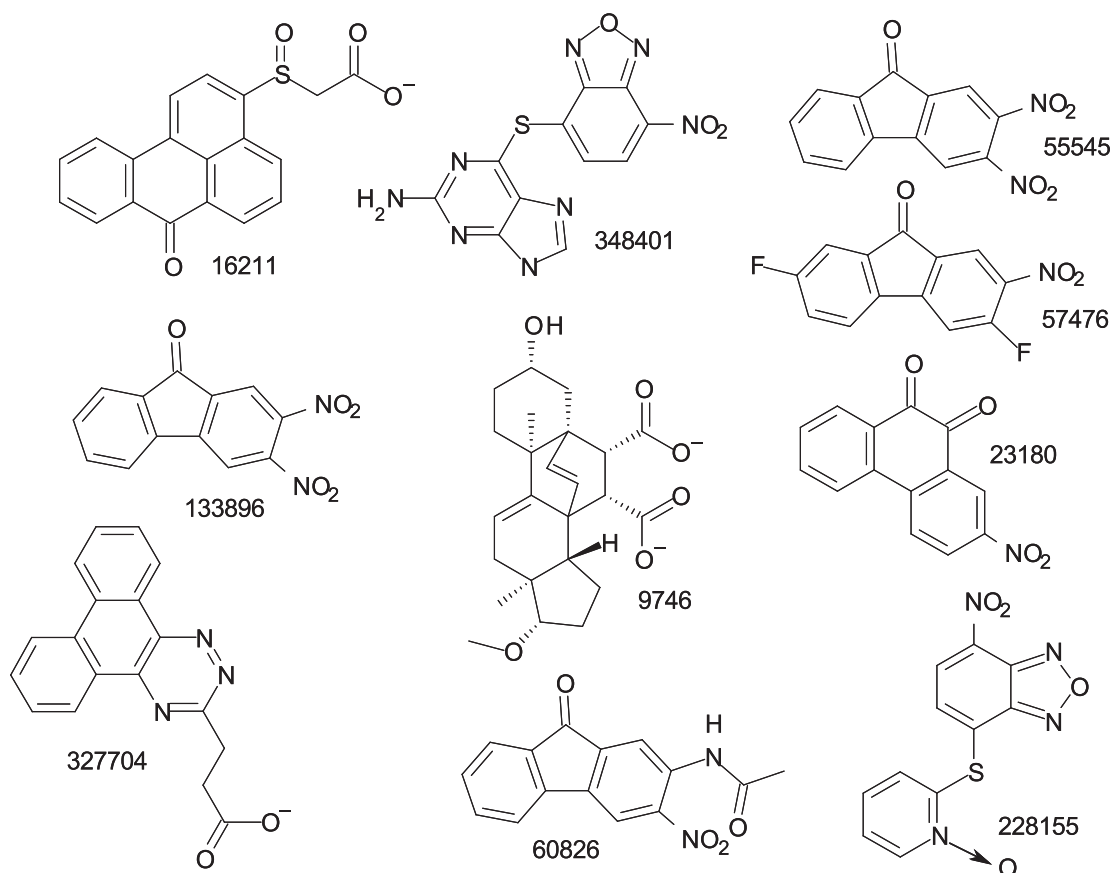
Obrázek 49: Syntéza cysteinu (76)

2.5.3.1. Inhibitory APS-reduktasy

Sloučeniny na obrázku 50 byly na základě screeningu databází sloučenin navrženy jako inhibitory APS-reduktasy. Jako nejvíce perspektivní se ukázala sloučenina 23180, sloučeniny 133896 a 327704 inhibovaly APS-reduktasu z 50%, sloučenina 348401 pak z 90% (77).

2.5.4. Respirační řetězec mykobakterií

Respirační řetězec mykobakterií (Obr. 52) obsahuje několik komplexů, přičemž každý z nich se skládá z několika polypeptidů a obsahuje několik elektronových přenašečů ať již ve formě hemu, flavinových prostetických skupin nebo atomů mědi. Centrálním místem respiračního řetězce je chinonový pool. Elektrony jsou transportovány pomocí dehydrogenas z cytoplazmy směrem k tomuto společnému chinonovému poolu. Chinol je oxidován v membráně vázanou reduktasou nebo cytochrom bc₁ komplexem a elektrony jsou přeneseny na terminální elektronový receptor. Společně s transportem elektronů dochází k pohybu protonů přes cytoplasmatickou membránu do periplasmatického prostoru čímž dochází k vytvoření elektrochemického gradientu. Při transportu těchto protonů prostřednictvím ATP synthasy zpět do cytoplazmy dochází ke vzniku ATP.

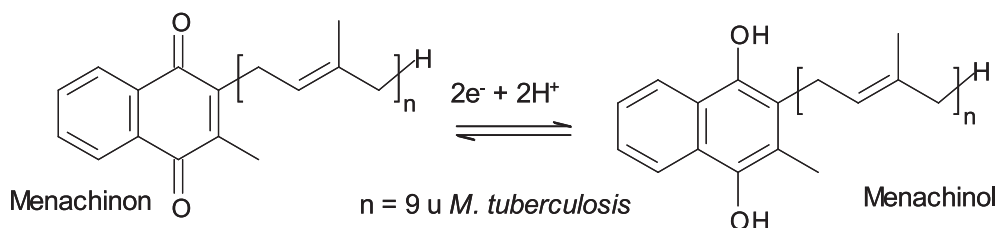


Obrázek 50: Inhibitory APS-reduktasy (77).

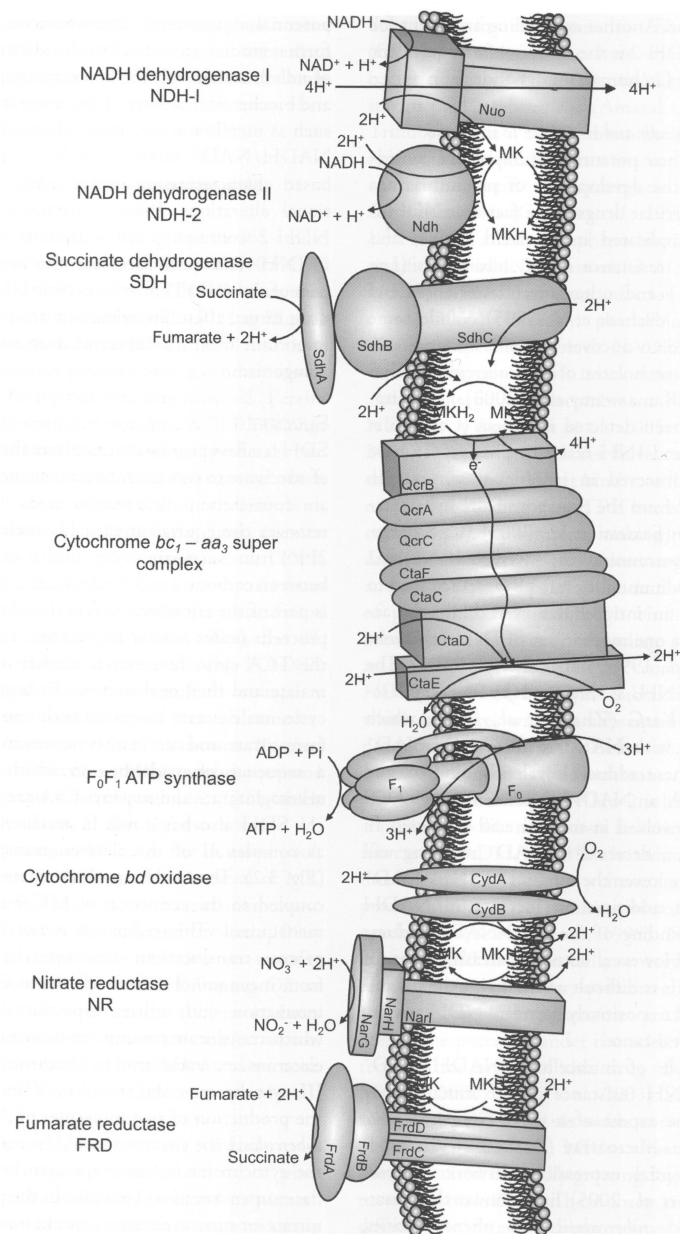
V respiračním řetězci mykobakterií se vyskytuje celá řada modifikací, které umožňují přežití této bakterie jak za aerobních, tak i za anaerobních podmínek. Přehled enzymů účastnících se respiračního řetězce ukazuje obrázek 52 (67).

Menachinon (MK) (Obr. 51)

Menachinon je bakteriální lipochinon, který hraje klíčovou roli v dýchacím řetězci mykobakterií. Jedná se o 2-methyl-1,4-naftochinon, který obsahuje různě dlouhý řetězec. U *M. tuberculosis* je tento řetězec tvořený devíti isoprenovými jednotkami (MK 9). Jelikož se menachinon u člověka nevyskytuje, představuje ideální cíl pro účinek antituberkulotik (67).



Obrázek 51: Menachinon / menachinol



Obrázek 52: Dýchací řetězec. Převzato z Parish, Brown, 2009 (67)

Sukcinátdehydrogenasa (SDH), Fumarátreduktasa (FRD)

SDH a FRD jsou strukturně podobné flavoproteiny, které se liší ve směru přeměny sukcinát/fumarát.

SDH je tvořena homotrimery, FRD dimery. Každý protomer se přitom skládá ze tří až čtyř podjednotek. Jedná se o podjednotky A a B a o podjednotku C, u některých kmenů je i podjednotka D (67).

NADH:menachinonoxidoreduktasa

(NADH dehydrogenasa) (NDH)

NDH společně se sukcinátdehydrogenasou (SDH) zajišťují vstup elektronů do dýchacího řetězce a jejich přenos z NADH směrem k chinonovému poolu. Přispívají tak k obnovení NAD^+ . NDH je polypeptid skládající se ze 463 aminokyselin. U *M. tuberculosis* lze rozlišit tři typy NDH: NDH-1, NDH-2 a NDH-2A. (*M. marinum* má tři typy NDH; *M. leprae* a *M. smegmatis* pouze jeden typ) (67).

Cytochrom bd oxidasa

Tento enzym katalyzuje přímou oxidaci menachinolu a redukuje kyslík na vodu. Redukce kyslíku ale není v tomto případě spojena s transportem protonů přes membránu a je tedy z energetického hlediska méně efektivní (67).

Superkomplex cytochrom bc1-reduktasy a cytochrom c oxidasy

Tento komplex katalyzuje oxidaci menachinolu. Transport elektronů a redukce kyslíku na vodu je spojena s transportem protonů přes membránu (67).

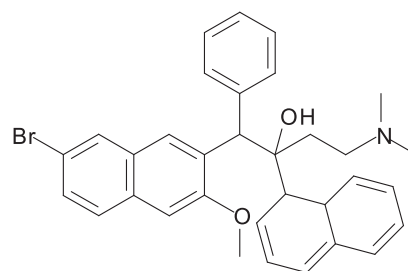
F₀F₁ ATP synthasa

Jedná se protein, kterým dochází k návratu protonů z periplasmatického prostoru zpět do cytoplasmy a tím i k vyrovnání gradientu. Skládá se ze segmentu F₀ a segmentu F₁. Segment F₀ slouží k posouvání protonů, zatímco část F₁ umožňuje fosforylaci ADP + Pi za vzniku ATP (67).

2.5.4.1. Antituberkulotika působící na úrovni respiračního řetězce

R207910 (značen i jako TMC207) (Obr. 53)

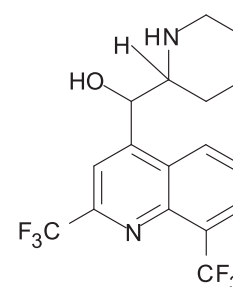
Tato sloučenina patří do skupiny diarylchinolinů. R207910 působí i na multirezistentní a atypické kmeny jako je *M. fortuitum* a *M. abscessus* a zároveň nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními antituberkulotiky. Mechanismus účinku spočívá v inhibici ATP synthasy (78). V současné době se nachází ve druhé fázi klinických testů (51).



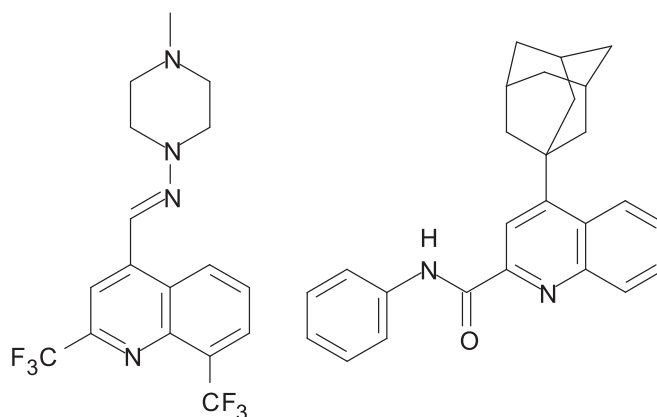
Obrázek 53: R207910.

Meflochin a jeho deriváty (Obr. 54)

Meflochin byl původně používán k léčbě malárie. Velký zájem vzbudil objev jejího inhibičního vlivu na ATP-synthasu. Na základě QSAR byly připraveny další deriváty této sloučeniny (Obr. 55) (48).



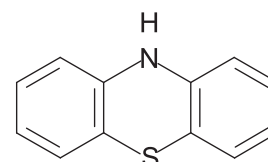
Obrázek 54: Meflochin



Obrázek 55: Meflochin

Skupina fenothiazinů (Obr. 56)

Bylo prokázáno, že sloučeniny patřící do této skupiny, např. chlorpromazin, thioridazin a zejména trifluorperazin, vykazují antimykobakteriální aktivitu (79). Předpokládá se, že fenothiaziny působí na úrovni NDH-2 a NDH-2A (67).



Obrázek 56: Fenothiazin

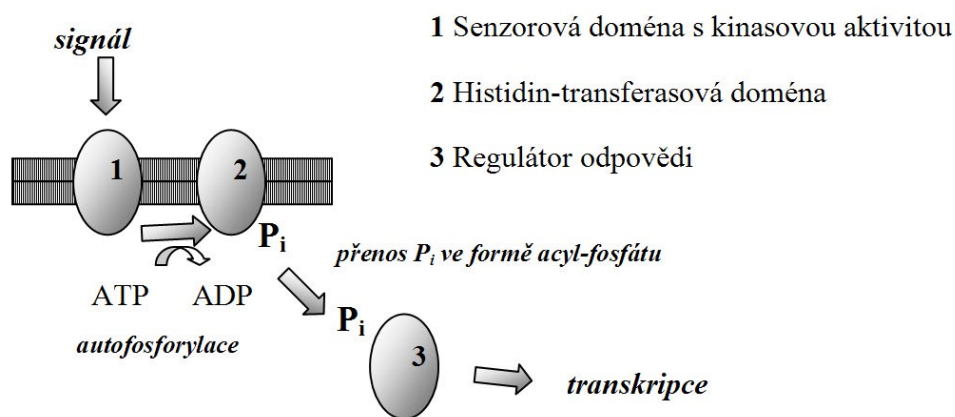
2.5.5. Dvousložkové systémy mykobakterií

Rozpoznání specifických signálů a jejich konverze do transkripce specifických genů umožňuje bakteriím přežít za různých životních podmínek (80). U dvousložkových systémů lze rozlišit sensor a regulátor odpovědi. Regulátorem odpovědi je často přímo transkripční faktor.

U sensoru, který je umístěn v buněčné membráně (67) lze rozlišit dvě domény: vlastní sensor s kinasovou aktivitou a doménu s histidin-transferasovou aktivitou (81).

Regulátor nacházející se v cytosolu (67) je také složen ze dvou domén, a to z domény aspartátové a domény signální, která váže DNA (output doména) (81).

Dvousložkový systém bakterií (Obr. 57) funguje tak, že sensorová doména sensoru rozpozná signál, rozpoznání signálu aktivuje kinasu k autofosforylaci histidinového zbytku fosfotransferasové domény. Následuje přenos P_i ve formě acyl-fosfátu na zbytek asparagové kyseliny u aspartátové domény regulátoru odpovědi. Dochází tak pravděpodobně ke konformačním změnám ve druhé regulátorové doméně a následuje transkripce, jejíž produkty jsou odpovědí na signál z okolí (81).

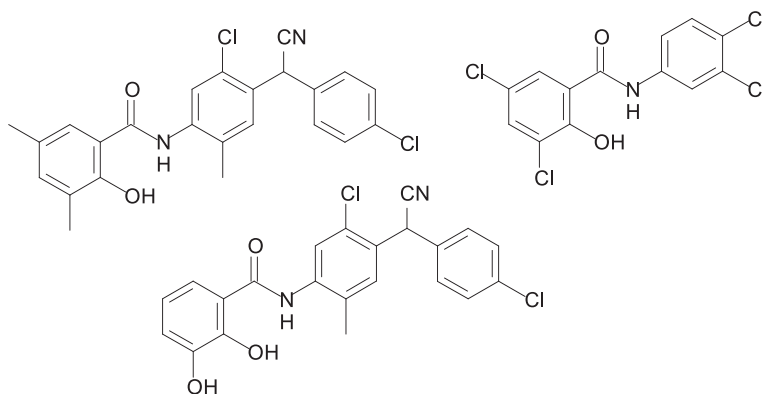


Obrázek 57: Dvousložkový systém. Převzato a upraveno dle Macela a kol., 2006 (81)

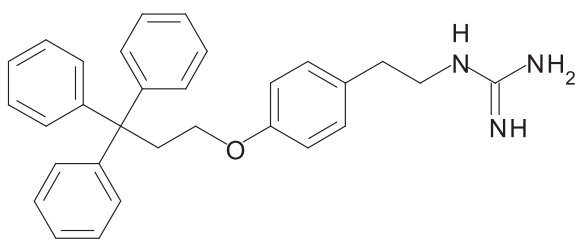
U *M. tuberculosis* existuje více dvousložkových systémů, každý je specifický pro určitý podnět. Jedná se např. o systém PhoP-PhoQ, který kontroluje expresi virulentních genů, systém PrrA-PrrB, jehož význam není doposud přesně znám nebo o systém MprA-MprB (81).

2.5.5.1. Sloučeniny, u kterých se předpokládá působení na dvousložkové systémy

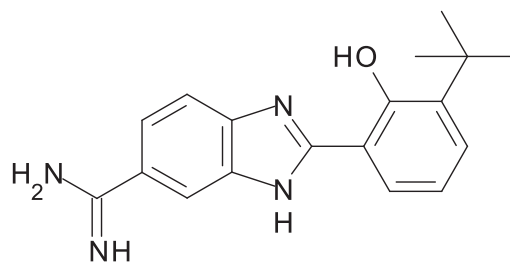
Salicylanilidy (Obr. 58), skupina tritylů (Obr. 59) a benzimidazolů (Obr. 60)



Obrázek 58: Salicylanilidy (80)



Obrázek 59: Příklad tritylu (80)



Obrázek 60: Příklad benzimidazolu (80)

2.5.6. Serin/threonin kinasy

Reverzibilní fosforylace proteinů je významným mechanismem, kterým bakterie reagují na signály z okolního prostředí (82). Sekvenční analýza genomu *M. tuberculosis* prokázala existenci genů kódujících 11 dvoukomponentových systémů a 11 serin/threonin kinas (67) PknA až PknL. (82). Kromě PknG a PknK, které existují v podobě rozpustných proteinů se všechny ostatní mykobakteriální kinasy vyskytují jako transmembránové proteiny podobné receptorům (82).

Serin/threonin kinasy vykazují stejnou funkci jako dvousložkové systémy, tj. účastní se odpovědi na signály z vnějšího prostředí (67). Tyto kinasy se také skládají ze sensoru, který je zde tvořen receptorovou doménou a doménou vykazující kinasovou aktivitu. Receptorová doména přijme signál z vnějšího prostředí, následuje změna konformace a aktivace kinas. Poté dochází k přenosu fosfátu na akceptor serinu nebo threoninu u substrátu.

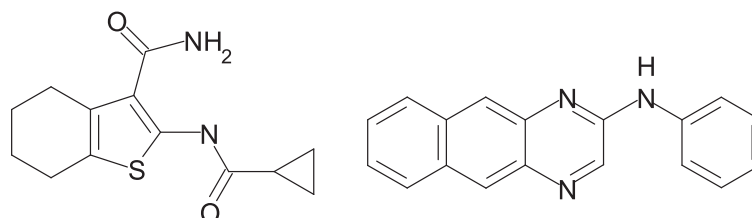
Serin/threonin kinasy mohou podobně jako dvousložkové systémy představovat vhodné cíle pro léčiva jelikož hrají klíčovou roli přenosu signálů a zároveň kontrolují důležité buněčné procesy (67).

Serin/threonin kinasy ovlivňují také interakci host-patogen a růst bakterií. Nejvíce prozkoumanými jsou kinasy PknA, PknB a PknG. O PknA a PknB je známo, že ovlivňují tvar mykobakteriální buňky. Tyto dvě kinasy jsou součástí operonu Rv0014c-Rv0018c, který dále obsahuje fosfatasu PstP a enzym PBPA, který má podíl na syntéze peptidoglykanu. Bylo zjištěno, že nadměrná exprese těchto kinas způsobuje pomalý růst mykobakterie a její zakulacenější buněčný tvar, zatímco při potlačení jejich exprese mají mykobakteriální buňky tvar spíše protáhlý a rovný (82).

2.5.6.1. Inhibitory serin/threonin kinas

Deriváty benzothiofenu a benzochinoxalinu (Obr. 61)

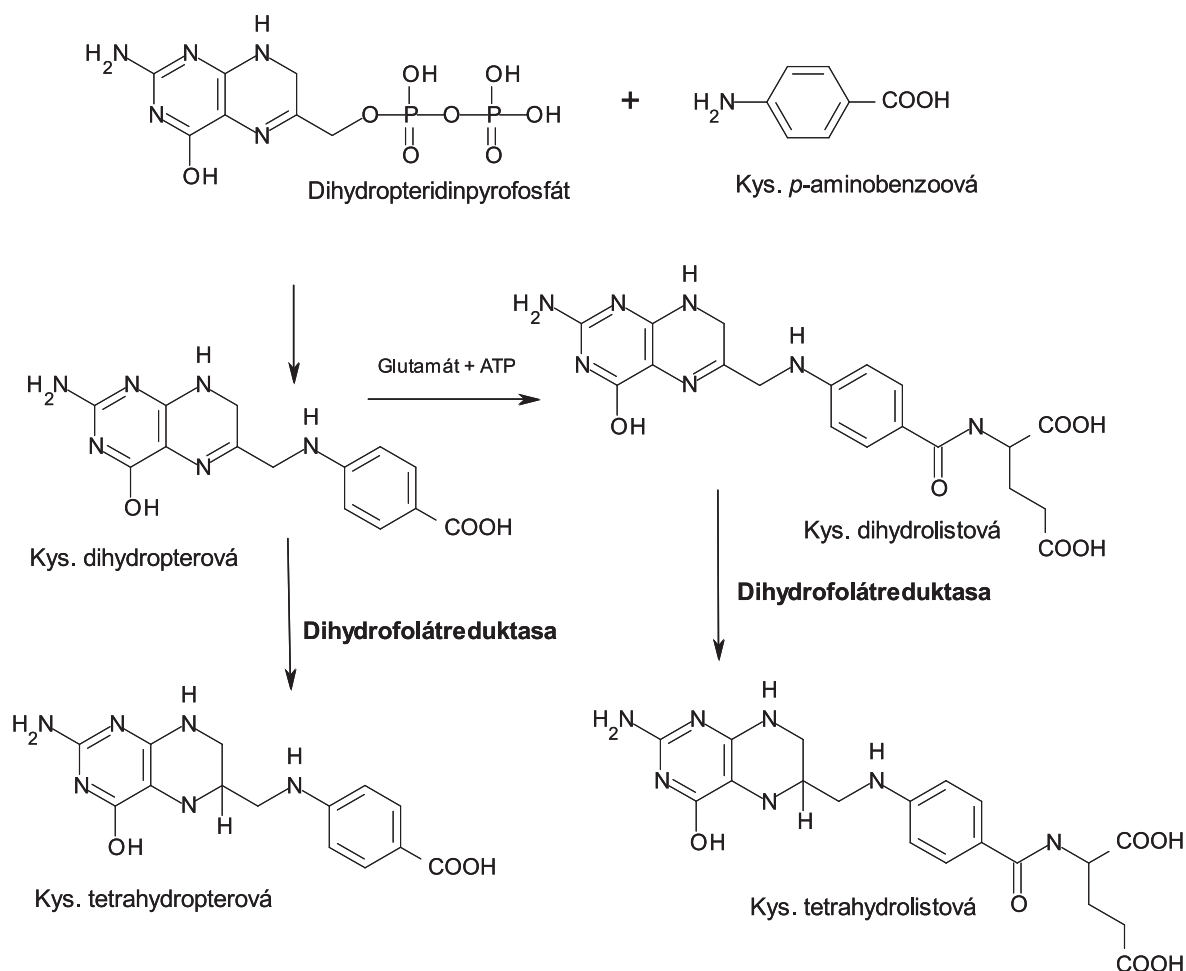
Literatura udává, že některé deriváty benzothiofenu a benzochinoxalinu byly patentovány jako inhibitory serin/threonin kinas s pravděpodobným působením na PknG v případě benzothiofenu a PknB, PknG a PknH v případě benzochinoxalinu (48).



Obrázek 61: Inhibitory serin / threonin kinas

2.5.7. Syntéza kyseliny listové

Kyselina tetrahydrolistová je důležitým koenzymem při syntéze thyminu. Člověk přijímá kyselinu listovou v potravě a tato kyselina je pak v organismu redukována na kyselinu dihydrolistovou a tetrahydrolistovou. Kyselina tetrahydrolistová je pomocí membránových přenašečů transportována dovnitř do buňky. Jelikož u bakterií není tento transportní systém vytvořen, dochází k syntéze kyseliny listové přímo z prekurzorů, tj. dihydropterindifosfátu a kyseliny *p*-aminobenzoové (Obr. 62) (83).

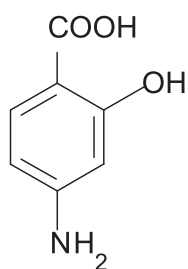


Obrázek 62: Syntéza kyseliny listové u bakterií. Převzato a upraveno dle Franklin a Snow, 2005 (20)

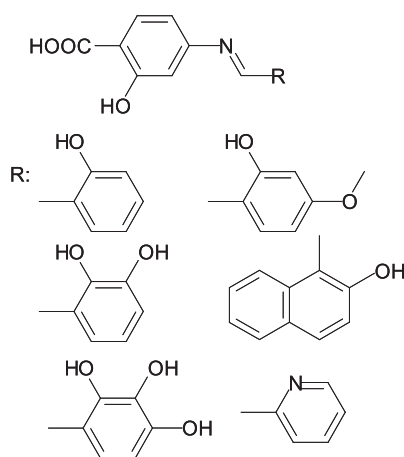
2.5.7.1. Inhibitory dihydrofolátreduktasy

Inhibitorů dihydrofolátreduktasy se využívá při léčbě celé řady bakteriálních a protozoálních onemocnění. Dihydrofolátreduktasa katalyzuje redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát, který se účastní celé řady procesů bakteriální buňky. Inhibice dihydrofolátreduktasy u bakterií ovlivňuje biosyntézu nukleotidů, methioninu, serinu a glycinu. Má vliv na syntézu DNA, RNA i na proteosyntézu (84).

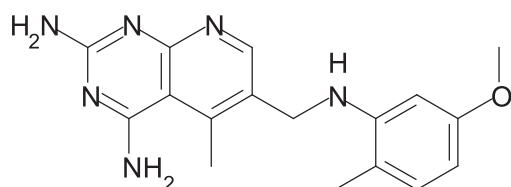
Dihydrofolátreduktasa bakterií se od lidské liší, což umožňuje vývoj selektivních inhibitorů. Nejznámější sloučeninou, o které je známo, že inhibuje dihydrofolátreduktasu je trimetoprim, který se používá proti celé řadě bakteriálních onemocnění. Trimetoprim stejně jako epiroprim mají pouze slabý účinek na mykobakterie, na jejich základě ale byly odvozeny nové deriváty, které jsou vůči mykobakteriím aktivní (48).



Obrázek 63: PAS



Obrázek 64: Schiffovy báze



Obrázek 65: Derivát 2,4-diamino-5-methyl-5-deazapteridinu

Kyselina *para*-aminosalicylová (Obr. 63)

Kyselina *p*-aminosalicylová je jedním z nejstarších antituberkulotik. Za mechanismus jejího účinku se dříve považovala kompetitivní inhibice *p*-aminobenzoové kyseliny, konkrétně blokování syntézy kyseliny dihydrolistové (85). Existují ale i hypotézy, podle kterých by PAS mohla působit i na syntézu mykobaktinu (72).

Schiffovy báze odvozené od kyseliny salicylové (Obr. 64)

Tyto konjugáty s postranním řetězcem obsahujícím velké množství hydroxylových skupin vykazovaly zvýšenou antimykobakteriální aktivitu při testech na *M. smegmatis* a *M. bovis* (86).

Deriváty deazapteridinu (Obr. 65)

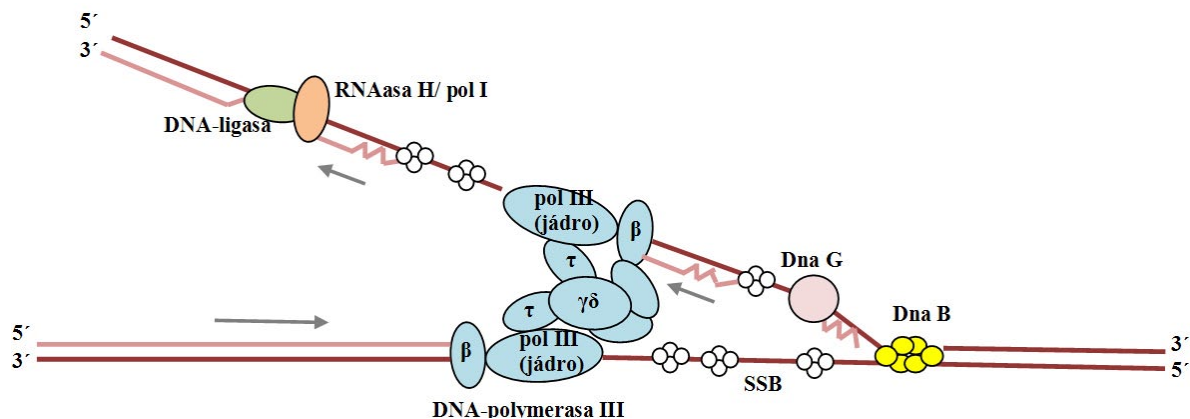
U řady derivátů deazapteridinu byla hodnocena jejich antimykobakteriální aktivita. Inhibici dihydrofolátreduktasy způsobovaly některé deriváty 5-deazapteridinu, které ve své molekule obsahovaly arylovou skupinu připojenou ať již přímo nebo pomocí methylenového můstku na 6-pozici pteridinového kruhu. Dále byla tato aktivita zjištěna u derivátů 2,4-diamino-5-benzylpyrimidinu, které byly odvozeny od trimethoprimu s cílem zvýšit antimykobakteriální aktivitu. Mezi sloučeniny s nejvyšší biologickou aktivitou patří deriváty 2,4-diamino-5-methyl-5-deazapteridinu, které vykazovaly vysokou účinnost proti kmenům *M. tuberculosis* a *M. avium* (84).

Naopak u skupiny derivátů 1-deaza-7,8-dihydropteridinu, které byly připraveny přímo jako antifoláty, nebyl potvrzen tento účinek. Sloučeniny jsou sice aktivní vůči kmenům *M. tuberculosis* a *M. avium*, ale další výzkum mechanismu jejich účinku vyvrátil hypotézu, že by mohly sloužit jako inhibitory dihydrofolátreduktasy. Mechanismus jejich účinku je tedy stále předmětem výzkumu (87).

2.5.8. Replikace bakteriální DNA

Replikace DNA u mykobakterií (Obr. 66) probíhá diskontinuálním způsobem. Na replikační vidlici se jeden řetězec na matricovém řetězci syntetizuje kontinuálně (vedoucí řetězec), zatímco druhý řetězec diskontinuálně přes Okazakiho fragmenty (opoždující se řetězec) (88).

Replikace probíhá ve třech fázích. Jedná se o iniciaci, elongaci a terminaci.



Obrázek 66: Replikace mykobakteriální DNA. Vytvořeno dle www.genome.jpg (92)

Iniciace replikace

Počátek replikace *oriC* je rozeznán DnaA proteiny. K tomu je nutná nejprve aktivace těchto DnaA proteinů pomocí ATP. Aktivované DnaA proteiny se navážou na *oriC* a převedou jej do otevřené formy (38).

Po otevření *oriC* se na uvolněné DNA řetězce z obou protilehlých stran váže helikasa (DnaB protein). K navázání helikasy dochází za přítomnosti proteinu DnaC, který s helikasou tvoří komplex a zároveň dokáže rozeznat DnaA proteiny a umožňuje tak transport helikasy do počátku replikace. Přenos jedné molekuly helikasy probíhá za přítomnosti jedné molekuly ATP. Vzniká tak tzv. prepreprimingový komplex. Vzniku tohoto komplexu se účastní také HU-protein (histone like protein), který poté, jakmile dojde ke správné orientaci helikasy v místě *oriC*, zahájí rozvíjení dvoušroubovice (38).

Helikasy navázané v počátku replikace začnou odvíjet matricový DNA-řetězec ve směru 5'-3' konec za tvorby replikačních vidlic. Na vzniklé jednořetězcové úseky DNA se vážou SSB-proteiny (rozmotávací proteiny) (89), které udržují matricové řetězce v nataženém stavu, brání vytvoření vodíkových vazeb a tím i znovuoobnovení dvouřetězcové struktury. K navázání SSB-proteinů je potřebná ATP (90).

Elongace

Enzym DNA-primasa (Dna-G) protein vytvoří krátký úsek RNA- tzv. startovací očko (primer) pro DNA-polymerasu III, která pokračuje v elongaci (91).

Přítomnost RNA-primeru je nutná k syntéze vedoucího i opoždujícího se řetězce. Syntéza vedoucího řetězce probíhá kontinuálně a je pro ni tedy potřebný pouze jeden primer, který je syntetizován v počátku replikace. U opoždujícího řetězce je počet RNA-primerů roven počtu syntetizovaných Okazakiho fragmentů (90).

Na syntéze RNA-primerů se podílí enzym DNA-primasa. DNA-primasa (DnaG-protein) je aktivována DnaB proteinem. Komplex primasy s helikasou se označuje jako primozom. Tento primozom se pohybuje stejným směrem jako replikační vidlice, tj. proti směru prodlužování Okazakiho fragmentů (90).

Syntéza vedoucího řetězce probíhá na matricovém řetězci, který se vyznačuje 3'-5' směrem fosfodiesterových vazeb, zatímco syntéza opoždujícího se řetězce probíhá na matricovém řetězci se směrem fosfodiesterových vazeb 5'-3'. Okazakiho fragmenty se přitom prodlužují proti směru pohybu replikační vidlice (91).

Pomocí DNA-polymerasy III (Pol III) se na 3'-OH konec každého primeru napojují deoxyribonukleosid -5'-trifosfáty. DNA řetězce obsahující RNA-primery jsou rozpoznány γ -komplexem DNA-polymerasy III, který na DNA řetězec připojí tzv. β -svorku. Tato svorka drží syntetizovaný řetězec pohromadě s řetězcem matricovým. Na vedoucí řetězec je připojena pouze jedna β -svorka, zatímco na opoždujícím řetězci se β -svorka připojuje na každém Okazakiho fragmentu. Tímto způsobem je pravděpodobně zajištěna koordinace syntézy vedoucího a opoždujícího se řetězce. DNA-polymerasa III je při syntéze Okazakiho fragmentu spojena s β -svorkou, po dokončení syntézy se rychle uvolní a za sebou zanechá β -svorku. Uvolněná DNA-polymerasa III se okamžitě spojí s novou svorkou na jiném místě, kde se nachází RNA-primer (90).

Nakonec dochází k odstranění všech RNA-primerů a k vytvoření souvislého řetězce pospojováním DNA-fragmentů. Tohoto procesu se účastní enzym DNA-polymerasa I (Pol I), která se pohybuje za DNA-polymerasou III, postupně odstraňuje RNA-primery a doplňuje vzniklou mezeru. DNA-ligasa poté takto doplněné fragmenty pospojuje v souvislý řetězec (90).

Terminace

Terminus (*terC*) je úsek chromozomu, kde končí replikace bakteriálního chromozomu. Tento úsek se nachází přesně naproti počátku *oriC* (38).

Na *terC* se váže tzv. Tus-protein, který inhibuje aktivitu helikasy, čímž dochází k zastavení tvorby replikační vidlice. Replikační vidlice se dostanou do oblasti terminátoru, vzájemně se propletou a vytvoří katenan. Topoisomerasa II (DNA-gyrasa) následně katalyzuje dekatenaci a přechod obou kružnicových DNA do dceřiných buněk (90).

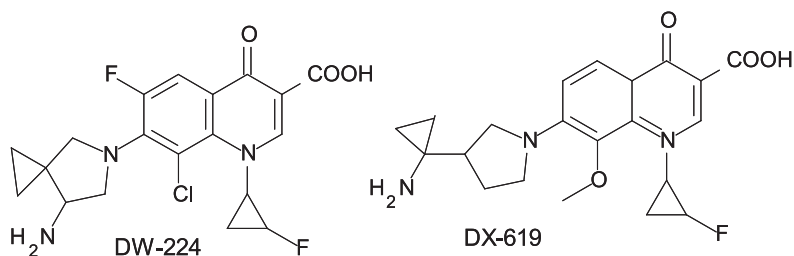
Výzkum replikačního času prokázal, že rychlost replikace u *M. tuberculosis* je 3200 nukleotidů za minutu. Probíhá tak 11krát pomaleji než u *M. smegmatis* a 13-18 krát pomaleji než u *E. coli* (88).

2.5.8.1. Inhibitory replikace bakteriální DNA

Fluorochinolony

Fluorochinolony jsou z hlediska léčby tuberkulózy slibnou skupinou sloučenin, které snadno pronikají do buněk a působí tak i na intracelulární mykobakterie (51). Účinek fluorochinolonů spočívá v inhibici ATP-dependentní DNA-gyrasy (topoisomerasa II). Mezi chinolony patří např. ciprofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin a sitafloxacin. Do fáze preklinických testů se dostala sloučenina DW-224 (48) a sloučenina DX-619, která vykazuje účinek i proti rezistentním kmenům (Obr. 67) (93).

Rezistence bakterií vůči chinolonům spočívá v mutaci mykobakteriálních genů *gyrA* a *gyrB*. Doposud nebyla prokázána zkřížená rezistence mezi chinolony a antituberkulotiky první linie. Byla však zjištěna zkřížená rezistence mezi jednotlivými chinolony (51).

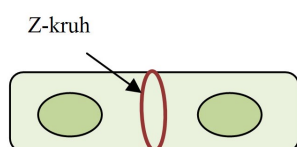


Obrázek 67: DW-224 a DX-619

2.5.9. Dělení mykobakteriálních buněk

Dva identické chromosomy vzniklé replikací DNA musí být rozděleny do dceřinných buněk. K tomuto rozdělení dochází u bakterií záhy po zahájení replikace bakteriální DNA. Rozestup dceřinného a mateřského chromozomu je doprovázen tvorbou tzv. divizomu, který vzniká ve střední části buňky. Tento divizom se podílí jak na rozdělení DNA, tak i na tvorbě peptidoglykanu a konečném rozdělení mateřské buňky pomocí buněčné přepážky (septa) na dvě buňky dceřinné (82).

Prvním cytoskeletárním proteinem, který byl u bakterií prozkoumán, je protein označovaný jako FtsZ. Jedná se o protein příbuzný eukaryotickému tubulinu (82). Jelikož FtsZ obsahuje sekvenci, která je u tubulinu spojená s vazbou GTP, předpokládá se, že FtsZ může podobně jako tubulin vázat GTP a fungovat tak jako GTPasa (94).



Obrázek 68: Z-kruh.

FtsZ se při buněčném dělení shromažďuje ve středu buňky, kde vytváří dynamickou strukturu podobnou kruhu, tzv. Z-kruh. Tento Z-kruh (Obr. 68) je základní kostrou, ke které se připojují další proteiny účastnící se dělení bakteriální buňky. Tyto proteiny společně s FtsZ vytváří již zmiňovaný divizom (95).

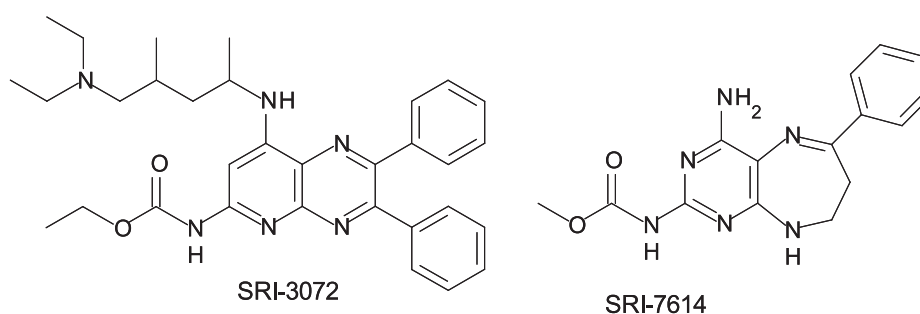
Z proteinů podílejících se na tvorbě buněčného septa jsou u mykobakterií známy FtsE, FtsI, FtsK, FtsQ, FtsW, FtsX, AmiC a EnvC. Role proteinů FtsE a FtsX je dosud neznámá, ví se pouze, že patří do rodiny ABC transportérů. FtsI je transpeptidasa patřící mezi tzv. penicilin binding proteins (konkrétně PBP₃) a účastní se syntézy septálního peptidoglykanu. FtsQ je transmembránový protein, který spojuje cytoplasmatickou a periplasmatickou membránu a účastní se celé řady interakcí mezi proteiny (82). FtsW je členem rodiny SEDS (Shape, Division and Sporulation) proteinů. Jeho pravděpodobná role spočívá v transportu prekurzorů peptidoglykanu do periplasmatického prostoru, kde pomocí specifických transpeptidas dochází k jejich utilizaci (95). Amidasa AmiC a hydrolasa EnvC hydrolyzují septální peptidoglykan a umožňují tak rozdělení mateřské buňky na dvě dceřinné (82).

O mykobakteriích je známo, že v pozdějších stádiích buněčného dělení tvoří tvar písmena V. Příčinou je ukládání většiny nově vytvořeného peptidoglykanu na pólech a vnější straně tohoto V. Při dělení mykobakteriální buňky zůstávají nejprve dceřinné buňky spojeny vnějšími membránami a teprve později dochází k oddělení dceřinných buněk (82).

2.5.9.1. Inhibitory buněčného dělení

Deriváty 2-alkoxykarbonylaminopyridinu

Při hledání potenciálních antituberkulotik bylo prozkoumáno i 200 derivátů 2-alkoxykarbonylaminopyridinu, které byly původně syntetizovány jako inhibitory eukaryotického tubulinu. U několika sloučenin byl objeven antimykobakteriální účinek. Jako nejperspektivnější se ukázaly sloučeniny SRI-3072 a SRI-7614, které vykazovaly účinek proti *M. tuberculosis* (Obr. 69). Tyto sloučeniny působí jako inhibitory polymerace FtsZ (96).



Obrázek 69: SRI-3072, SRI-7614

2.5.10. Transkripce

Transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu matricové chromozomální DNA, která slouží jako templát, za vzniku všech funkčních typů RNA (89). Mezi primární transkripty patří pre-rRNA, pre-tRNA a mRNA, která je primárním transkriptem strukturních genů. Základní transkripční jednotku tvoří promotor, který spolu s operátorem tvoří operon a startovací nukleotid (90).

Hlavním enzymem transkripce je RNA-polymerasa (transkriptasa). RNA-polymerasa má molekulovou hmotnost přibližně 400 kDa (97). Jedná se o holoenzym skládající se ze dvou α -podjednotek, které se vážou na promotor, jedné β -podjednotky, která zajišťuje vazbu ribonukleotidů na polymerasu, dále lze rozlišit β' -podjednotku zajišťující spojení polymerasy s matricovým řetězcem a σ -podjednotku, která rozezná sekvenci kolem nukleotidu 35 a zajišťuje tak navázání RNA-polymerasy na promotor a nikam jinam (20, 90).

Promotor obsahuje dvě místa, která jsou specifická pro určitou RNA-polymerasu. Jedná se o místo poznávací, které se nepřepisuje do syntetizované RNA (sekvence kolem nukleotidu 35) a místo vazebné, které obsahuje vyšší množství párů A-T (sekvence kolem nukleotidu 10, tzv. Pribnowův box). Vysoký obsah párů A-T umožňuje snadnější lokální denaturaci a vzájemné oddělení obou závitnic od sebe (89, 91).

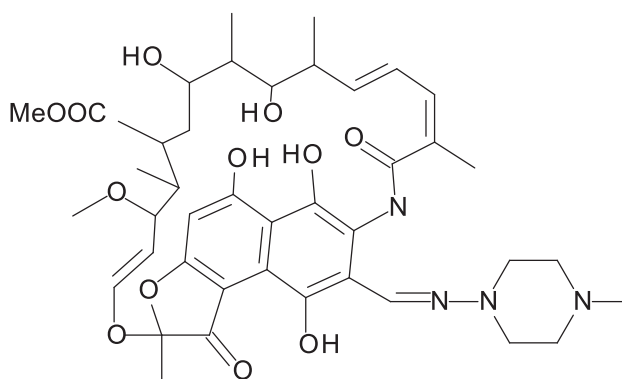
Vlivem σ -faktoru dojde k nasednutí RNA-polymerasy na poznávací místo promotoru, což vede k lokálnímu rozvolnění závitnic na vazebném místě a k pevnému navázání RNA-polymerasy na promotor. Na iniciačním místě pak začíná vlastní transkripce (38). Ke konci iniciační fáze dochází k uvolnění σ -faktoru místo něhož se váží NusA protein. Tento NusA protein zůstává navázán až do fáze terminace. Po jeho uvolnění z terminátoru je opět nahrazen σ -faktorem, který se podílí na zahájení další iniciace transkripce (90).

Při elongaci je rostoucí řetězec RNA připoután krátkým úsekem hybridního DNA-RNA komplexu k předlohovému řetězci DNA. K růstu řetězce RNA dochází na 3' konci, po dosažení příslušné délky dochází k terminaci, řetězec RNA se uvolňuje a rozvolněná dvojšroubovice DNA nabývá své původní konformace (38).

2.5.10.1. Antituberkulotika inhibující RNA-polymerasu

Rifampicin (Obr. 70)

Rifampicin patří mezi antituberkulotika 1. linie. Působí tak, že se váže na β -podjednotku DNA-dependentní RNA-polymerasy. Studie struktury společně s biochemickou analýzou prokázaly, že rifampicin nemá vliv ani na funkci promotoru ani na tvorbu otevřeného komplexu. Bylo ale zjištěno, že rifampicin přímo blokuje elongaci, jakmile RNA-transkript dosáhne délky 2-3 nt. Krystalová struktura komplexu rifampicinu s RNA-polymerasou vede k předpokladu, že rifampicin funguje jako sterická zábrana (97). Rifampicin inhibuje polymerasu sterickým bráněním rostoucího řetězce RNA v okamžiku, kdy jsou k tomuto řetězci připojeny dva nebo nejvíce tři nukleotidy. Neinhibuje ale vytvoření fosfodiesterové vazby mezi prvními nukleotidy a nepůsobí ani v případě, pokud dojde k interakci mezi ním a RNA řetězcem až po vytvoření



Obrázek 70: Rifampicin

třetí fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy. V tomto případě již nedochází k ovlivnění pokračujícího procesu elongace (20). Obdobný účinek jako rifampicin mají také rifabutin a rifapentin (98).

2.5.11. Translace

Mykobakteriální ribozom (70S) je složen z malé (30S) a velké (50S) podjednotky. Na ribozomu lze rozlišit několik vazebných míst.

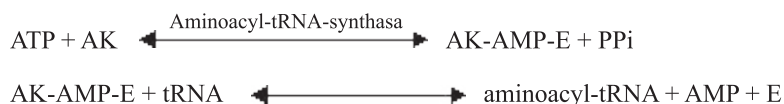
- vazebné místo pro mRNA, které je umístěno na 30S podjednotce,
- aminoacylové místo (A-místo), které se nachází z části na 30S a z části na 50S podjednotce,
- peptidylové místo (P-místo), které je z menší části na 30S a z větší části na 50S podjednotce,
- výstupní místo pro deacylovanou tRNA (E-místo),
- peptidyltransferasové místo vykazující peptidyl-transferasovou aktivitu katalyzující tvorbu peptidových vazeb,
- vazebná místa pro iniciační a elongační faktory (90).

U molekuly tRNA rozlišujeme dvě vazebná místa

- vazebné místo pro aminoacyl-tRNA-syntetasu,
- antikodon, který vytváří vazbu s kodonem (90).

K tomu, aby mohlo dojít k přenosu aminokyseliny pomocí tRNA, musí být aminokyselina nejprve aktivována. Na aktivaci se podílí enzymy aminoacyl-tRNA syntetasy.

Každá aminokyselina je přeměněna pomocí specifické aminoacyl-tRNA syntetasy na aminoacyladenylát, který je stabilizován asociací s enzymem. Takovýto aminoacyladenylátový komplex s enzymem poté interaguje se specifickou tRNA za vzniku aminoacyl-tRNA (54).



Iniciace

Na iniciaci se u prokaryot podílí tři proteinové faktory IF1, IF2 a IF3. Jako iniciační tRNA slouží *N*-formyl-methionyl-tRNA (fMet-tRNA). Iniciačním kodonem je AUG nebo GUG (20).

Při iniciaci dochází nejprve k rozdisociování 70S ribozomu na malou a velkou podjednotku (Obr. 71a). K 30S podjednotce se váže iniciační faktor IF3, čímž vzniká translační komplex mRNA - 30S - IF3 (Obr. 71b). Faktor IF3, který je součástí tohoto komplexu a brání opětovnému spojení obou podjednotek.

Při iniciaci dále dochází k navázání IF2 na fMet-tRNA za vzniku binárního komplexu, ke kterému se následně váže GTP a vzniká tak ternární translační komplex IF2 - fMet-tRNA - GTP (Obr. 71c). Iniciační faktor IF2 zajišťuje interakci IF2 - fMet-tRNA - GTP s komplexem mRNA - 30S - IF3. Touto interakcí se vytvoří přediniciační translační komplex mRNA - 30S - fMet-tRNA - GTP - IF3 - IF2 - IF1. Přediniciační komplex se nakonec destabilizuje uvolněním všech tří iniciačních faktorů (IF1-3) a za účasti GTP dochází k opětovnému spojení malé a velké podjednotky (Obr. 71d) (90).

Enzym peptiddeformylasa, což je metalopeptidasa obsahující železo v dvojmocném stavu, odstraní *N*-formyl ze vznikajícího peptidu (99).

Elongace

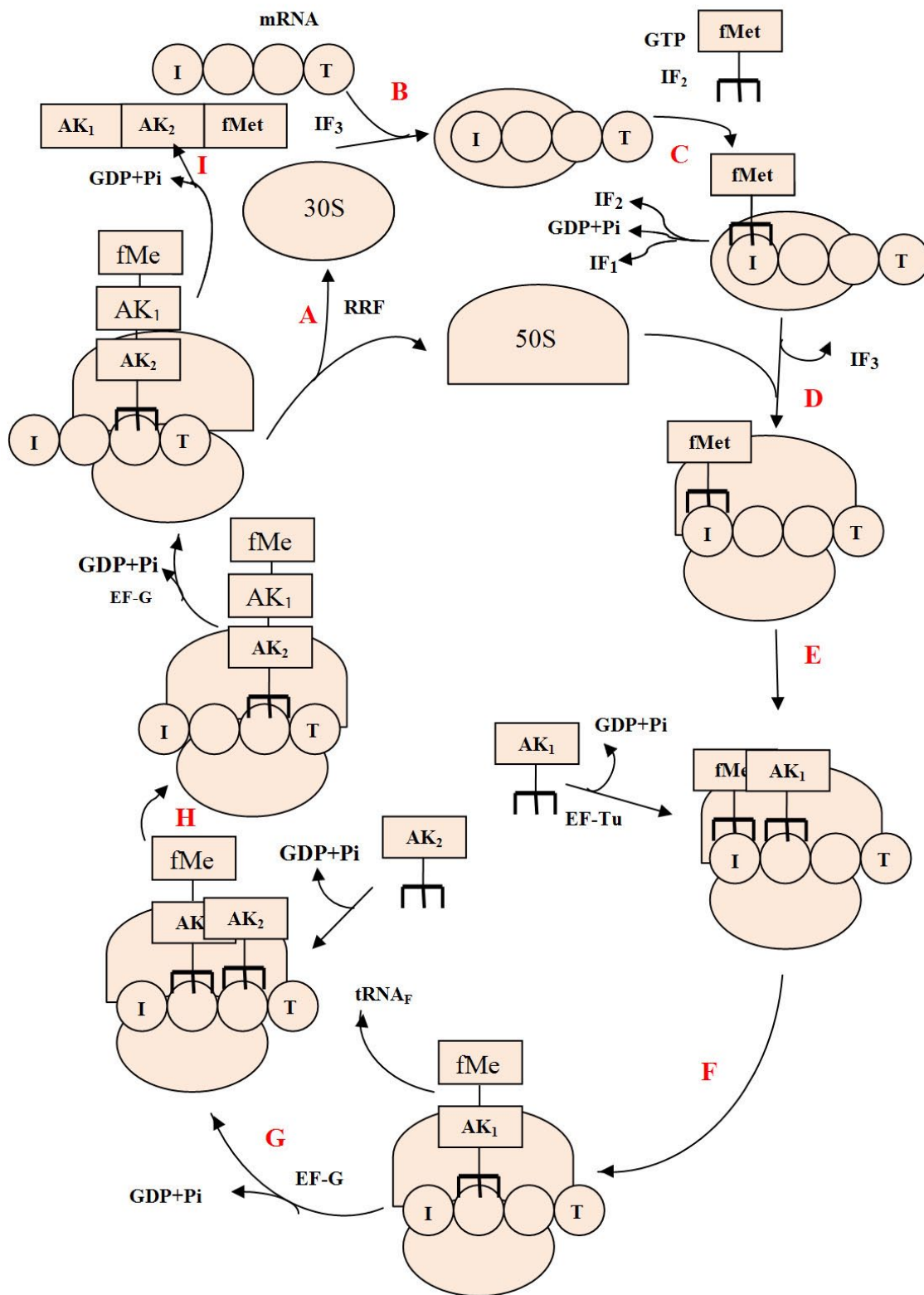
Mezi elongační faktory patří faktory EF-G, EF-Tu a EF-Ts.

Iniciační fMet-tRNA se při iniciaci váže přímo na P-místo. Navázání dalšího aminoacyl-tRNA na A-vazbené místo vyžaduje elongační faktory EF-Tu a EF-Ts.

EF-Tu je nejprve aktivován pomocí GTP a následně interaguje s aminoacyl-tRNA za vzniku aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP, který se váže na A-vazebné místo ribozomu (Obr. 71e) (91). Po obsazení A-místa aminoacyl-tRNA dojde k interakci antikodu a kodonu, který se nachází na mRNA a změní se konformace ribozomu (20). Hydrolýzou GTP se odštěpí Tu-GDP, který je za účasti elongačního faktoru EF-Ts recyklován zpět na GTP a EF-Tu (91).

Mezi karboxylovou skupinou *N*-formylmethioninu (P-místo) a aminoskupinou aminokyseliny (A-místo) se vytvoří peptidová vazba (Obr. 71f). Tvorba peptidové vazby je katalyzována peptidyltransferasou, která je součástí 50S podjednotky. Takto vytvořený dipeptid zůstává připojen svým C-koncem k tRNA nacházející se na A-vazebném místě. Následuje přemístění dipeptidyl-tRNA z A do P-místa. Tohoto přemístění se účastní elongační faktor EF-G a další molekula GTP (Obr. 71g, h).

Deacylovaná tRNA je po vytvoření peptidové vazby přesunuta na E-místo a opouští ribozom (20). Dochází k translokaci ribozomu; tedy k jeho posunu vždy o jeden kodon směrem k 3'konci až do vzniku peptidového řetězce potřebné délky (91).



Obrázek 71: Průběh translace. Vytvořeno dle Franklin a Snow, 2005 (20)

Terminace

K ukončení syntézy polypeptidového řetězce je vyžadována přítomnost terminačního kodonu (UAA, UGA nebo AUG) a terminačních faktorů RF1-3. Terminační faktor RF1 rozpozná terminační kodon UAA a UAG, RF2 rozezná UAA a UGA a RF3 podporuje účinek faktorů RF1 a RF2.

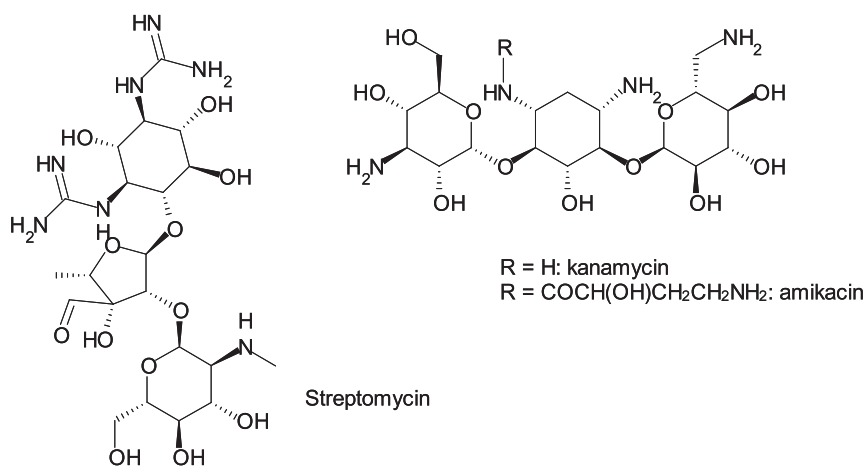
Za přítomnosti terminačních faktorů se uvolní tRNA z C-polypeptidového řetězce, čímž se zastaví jeho prodlužování. Polypeptidový řetězec opustí ribozom a ribozom se rozloží na malou a velkou podjednotku (Obr. 71i) (90).

2.5.11.1. Antituberkulotika působící na syntézu proteinů

Inhibitory interagující s 30S podjednotkou

Streptomycin, kanamycin a amikacin (Obr. 72)

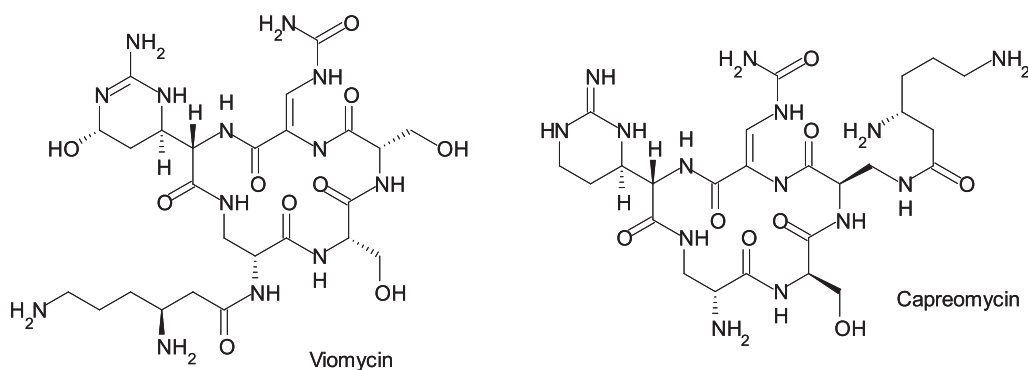
Jedná se o aminoglykosidová antibiotika působící na 30S podjednotku ribosomu (48). Streptomycin, který byl původně izolován ze *Streptomyces griseus*, brání navázání *N*-formylmethionyl-tRNA a zamezí tak iniciaci proteosyntézy (100).



Obrázek 72: Streptomycin, kanamycin a amikacin

Kapreomycin, viomycin (Obr. 73)

Kapreomycin a viomycin patří mezi cyklické peptidy. Mechanismus jejich účinku opět spočívá v inhibici proteosyntézy navázáním na 30S podjednotku ribosomu (48).

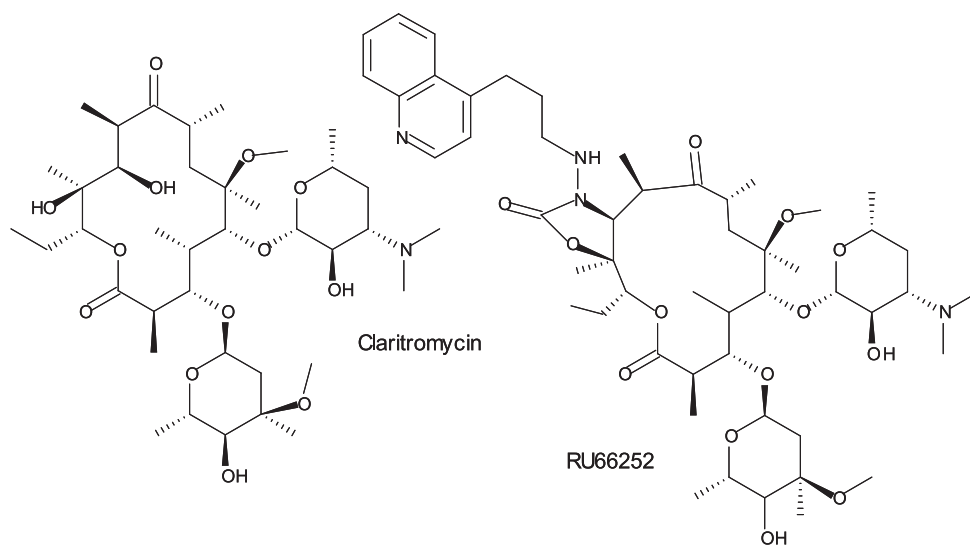


Obrázek 73: Viomycin, Kapreomycin

Inhibitory interagující s 50S podjednotkou

Klarithromycin, Telitromycin, RU66252 (Obr. 74)

Klaritromycin je makrolidové antibiotikum, které blokuje proteosyntézu navázáním na 50S podjednotku. Ačkoliv inhibuje růst *M. tuberculosis* in vitro, jeho in vivo aktivita je velmi slabá. Telitromycin je makrolidonové antibiotikum nové generace navržené s cílem obejít bakteriální rezistenci. Jeho lepší účinek ale nebyl prokázán. RU66252 vykazuje lepší výsledky při pokusu in vivo na myších než klaritromycin (101).

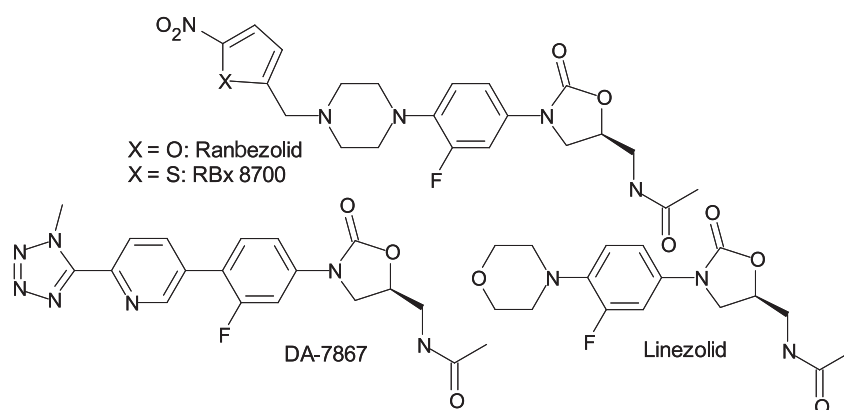


Obrázek 74: Klaritromycin, RU66252

Linezolid, Ranbezolid (RBx7644), RBx 8700 (Obr. 75)

U těchto oxazolidinonů se také předpokládá vliv na 50S podjednotku. Jelikož ale RBx7644 a RBx8700 obsahují ve své molekule nitroskupinu, lze uvažovat i o podobném mechanismu účinku jaký vykazují sloučeniny PA-824 a OPC-67683 (48). U linezolidu bylo zjištěno působení na peptidyltransferasu, která je součástí 50S podjednotky (20). Výhodou linezolidu

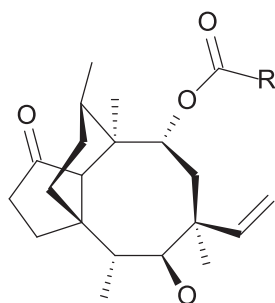
je jeho vysoká účinnost i proti MDR-TB. Aktivita linezolidu byla testována proti 117 klinicky izolovaným *M. tuberculosis* s různou citlivostí vůči antituberkulotikům 1. linie. Aktivita linezolidu byla proti všem těmto kmenům menší než 1 mg/l. Linezolid byl také s dobrými výsledky podáván u pacientů s MDR-TB, u kterých nezabrala předchozí léčba. Nevýhodou je však jeho toxicita pokud je podáván déle než 28 dní (102). Do skupiny těchto sloučenin patří i DA-7867, která také vykazuje aktivitu proti *M. tuberculosis* (48).



Obrázek 75: Linezolid a jeho deriváty

Pleuromutilin a jeho deriváty: tiamulin a valnemulin (Obr. 76)

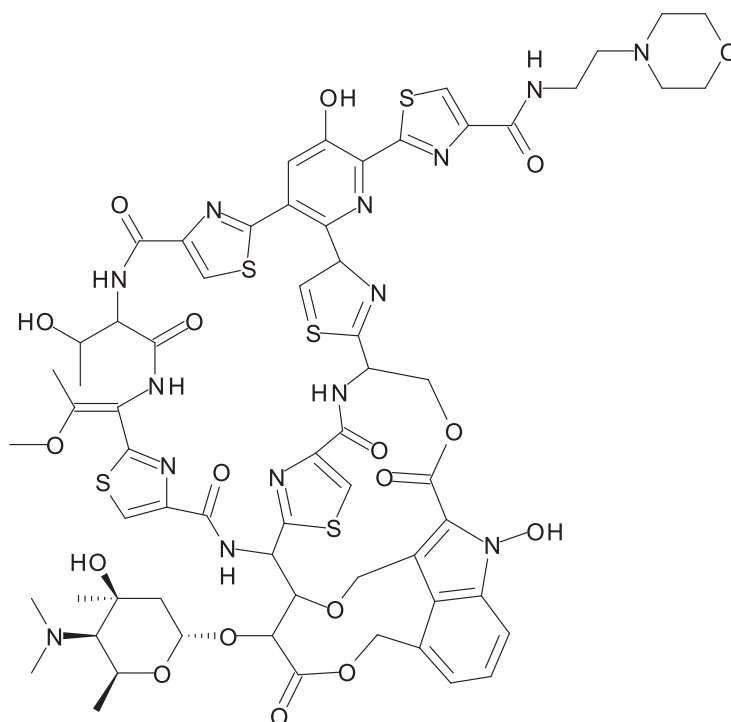
Pleuromutilin byl poprvé izolován z basidiomycety *Pleurotus mutilus* (dnes nazývána *Clitopilus scyphoides*). Pleuromutilin a jeho deriváty působí jako inhibitory proteosyntézy tím, že se váží na 50S ribozomální podjednotku. Jedná se o inhibitory peptidyltransferasy. Chemická struktura těchto sloučenin je velmi odlišná od struktury ostatních inhibitorů proteosyntézy (103).



Obrázek 76: R = CH₂OH: Pleuromutilin
R = CH₂SCH₂CH₂N(C₂H₅)₂: Tiamulin
R = CH₂SC(CH₃)₂CH₂NHCOCH(NH₂)CH(CH₃)₂: Valnemulin

Nocathiacin I a jeho deriváty

BMS-249524 (Nocathiacin I) byl původně izolován z *Nocardia sp.* (ACC 202099). Byla u něj zjištěná aktivita proti *M. tuberculosis*, *M. avium*, ale také i proti mnoha dalším bakteriálním kmenům včetně penicilin a vancomycin rezistentnímu kmeni *S. aureus* nebo penicilin rezistentnímu kmeni *S. pneumoniae*. Nevýhodou této sloučeniny je její velmi nízká rozpustnost ve vodě. Z tohoto důvodu byly připraveny deriváty BMS-411886 a BMS-461996 (Obr. 77), které jsou ve vodě lépe rozpustné a jsou stejně aktivní jako nocathiacin I (104).

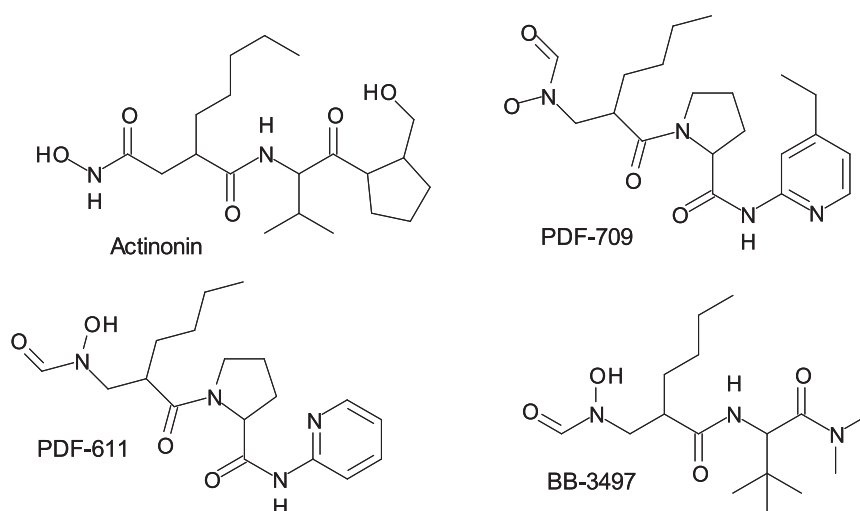


Obrázek 77: BMS-461996

Inhibitory peptiddeformylasy

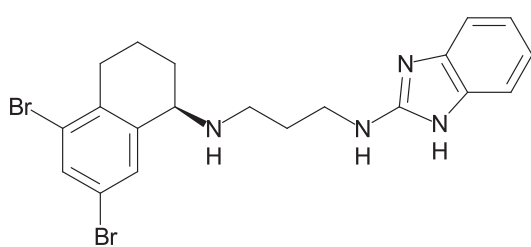
Actinonin, BB-3497, PDF-611 (LBK-611), PDF-709 (Obr. 78)

Actinonin je přírodní sloučenina, která byla poprvé izolována z kultury *Streptomyces sp.*. Již v roce 1969 byla popsána její vynikající biologická aktivita proti celé řadě bakterií. Díky této aktivitě, chemické stabilitě a nízké toxicitě byl actinonin označen jako významné antibiotikum (105). Až v současné době bylo zjištěno, že actinonin inhibuje peptiddeformylasu. Enzym peptiddeformylasa je sice znám již více než 30 let, ale kvůli jeho nízké stabilitě se jej dříve nepodařilo izolovat a charakterizovat. Jedná se o metaloenzym obsahující železo v dvojmocném stavu. Pokusy nahradit toto železo za nikl nebo kobalt byly úspěšné a vedly ke stabilizaci peptiddeformylasy při současném zachování její katalytické aktivity (99). Získání



Obrázek 78: Inhibitory peptiddeformylasy

stabilního enzymu umožnilo jeho charakterizaci a navržení jeho potenciálních inhibitorů. Jako nejvíce perspektivní se ukázaly sloučeniny BB-3497, PDF-611 (označována i jako LBK-611) a PDF-709 (106).



Obrázek 79: Inhibitor aminoacyl-tRNA-synthetasy (48)

Inhibitory aminoacyl-tRNA-synthetasy

Ve struktuře enzymu aminoacyl-tRNA-synthetasy jsou veliké rozdíly mezi eukaryoty a prokaryoty, které umožňují selektivní působení pouze na bakteriální enzym, ale zároveň se struktura tohoto enzymu příliš neliší v rámci bakteriální říše, což umožňuje využít inhibitory aminoacyl-tRNA-synthetasy (Obr. 79) jako širokospektrá antibiotika.

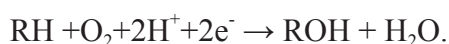
Celkem 20 aminoacyl-tRNA-synthetas, které se nachází ve většině patogenních bakterií tak představuje 20 nezávislých cílů pro potenciální léčiva. Výhodou těchto enzymů je jejich dobrá rozpustnost, stabilita a možnost izolace v čistém stavu a v relativně velkém množství (107).

2.5.12. Cytochromy P450 u mykobakterií

Sekvencováním mykobakteriálního genomu bylo překvapivě zjištěno, že tento genom obsahuje 20 cytochromů P450. Jedná se o specialitu v rámci bakteriální říše, jelikož tyto hem obsahující monooxygenasy jsou u bakterií spíše vzácné. Například *E. coli* nemá žádný P450 a u kmene *Bacillus subtilis* bylo nalezeno pouze sedm těchto enzymů, což je po

mykobakteriích považováno za největší počet (108). Lze říci, že hustota cytochromů P450 je v mykobakteriálním genomu 200krát větší než v genomu lidském (109). Takto velké množství cytochromů P450 vypovídá o jejich významné fyziologické roli (108).

Bakteriální cytochromy P450 jsou obecně monooxygenasy, které interagují redoxními systémy obsahujícími flavoprotein nebo Fe-S. Na aktivním místě P450 dochází nejčastěji k hydroxylaci substrátu, který se váže nedaleko cytochromového hemu. Při interakci se substrátem dochází k rozštěpení molekuly kyslíku. Zatímco první atom kyslíku slouží k hydroxylaci substrátu, druhý atom kyslíku je využit na tvorbu molekuly vody:



Elektrony pochází od redoxního partnera a k přenosu dochází za účasti NAD(P)H (110).

Nejvíce prostudovanými jsou CYP51 (108) a CYP121 (109), které byly zatím jako jediné studovány v podobě rekombinantních proteinů (111). Nedávno ale byly charakterizovány další cytochromy a to CYP130, 132 (111) a CYP125 (112).

Objevení CYP51 u mykobakterií vyvolalo veliké překvapení. Jedná se o 14 α -steroldemethylasu, která se eukaryot podílí na biosyntéze sterolů. U bakterií přitom syntéza sterolů neprobíhá. Vyskytly se sice studie potvrzující přítomnost cholesterolu u mykobakterií, ale jejich výsledky byly nakonec vyvráceny. Skutečný význam CYP51 v bakteriálním organismu tedy zůstává stále nejasný (109). Další možností je i účast cytochromu CYP51 při vstupu mykobakterií do makrofágů (111).

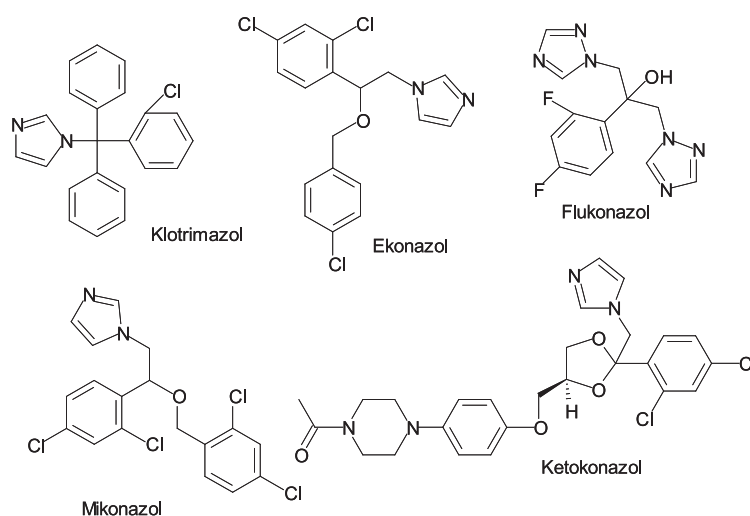
Úloha CYP121 v bakteriálním organismu také nebyla doposud objasněna. Tento cytochrom se nejvíce podobá cytochromu P450 eryF u *Saccharopolyspora erythraea*, který se účastní syntézy erytromycinu. Na základě této podobnosti se lze domnívat, že by se mykobakteriální CYP121 mohl podílet na syntéze polyketidů (109).

Biologická úloha CYP130 je pravděpodobně spojena s virulencí a CYP132 se nejspíše podílí na metabolismu mykobakteriálních mastných kyselin (111). U CYP125 se předpokládá účinek spojený katabolismem cholesterolu v hostitelském organismu a nebo účast na syntéze sloučenin důležitých pro přežití mykobakterie (112).

2.5.12.1. Inhibitory cytochromu P450

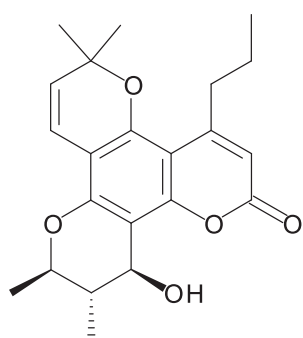
Skupina azolů (Obr. 80)

Studium mykobakteriálních P450 prokázalo vysokou afinitu některých původně antifungálních azolových sloučenin. Jedná se o velmi dobře známá léčiva klotrimazol, ekonazol, flukonazol, mikonazol a ketokonazol (108). Nejpravděpodobnějším cílem těchto antimykotik je CYP121, a to na základě silné korelace mezi jejich účinkem a afinitou k tomuto cytochromu (111, 110).



Obrázek 80: Inhibitory bakteriálního P450

2.5.13. Sloučeniny s neobjasněným mechanismem účinku

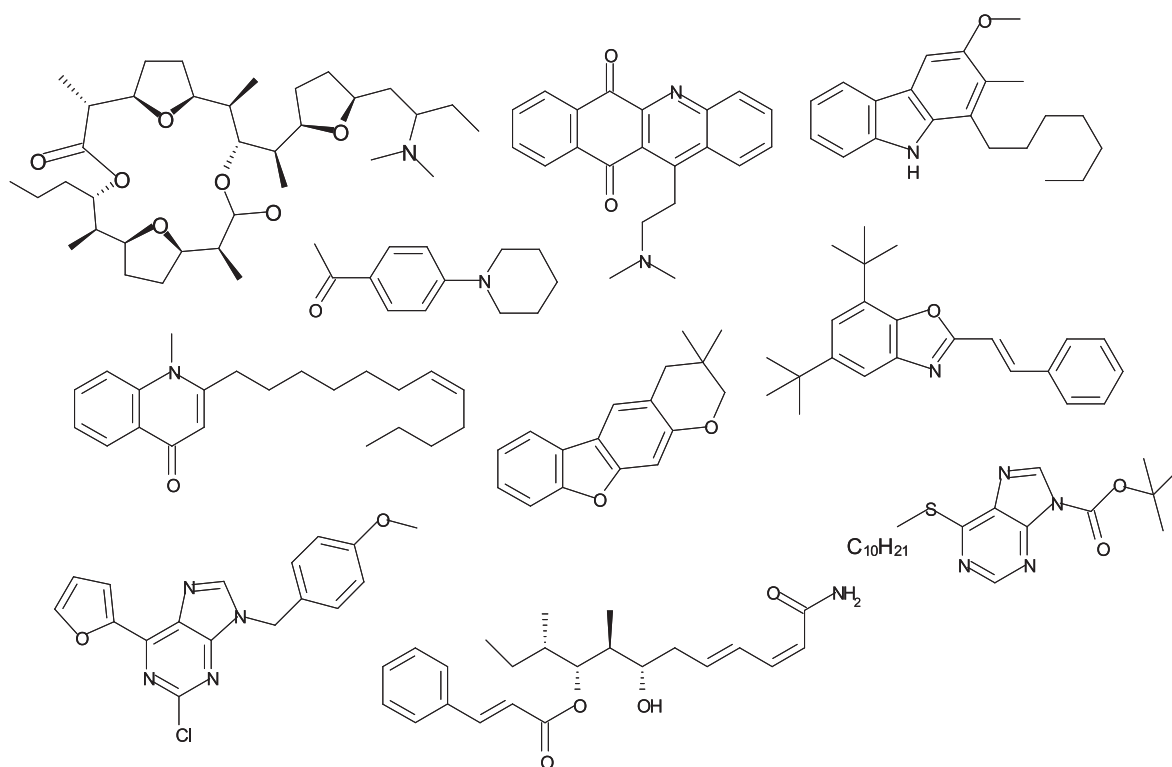


Obrázek 81:
(+)-Kalanolid A

Kalanolid A (Obr. 81)

Kalanolid A patří do skupiny přírodních látek – kumarinů, které byly původně izolovány ze stromu *Calophyllum lanigerum* rostoucího v Malajsii. (+)-Kalanolid A byl později syntetizován i de novo jelikož z přírodního zdroje bylo možné získat pouze omezené množství. Tato sloučenina prošla druhou fází klinických testů, kde byla hodnocena její aktivita proti viru HIV. Později u ní byla zjištěna i aktivita proti *M. tuberculosis* včetně kmenů vykazujících rezistenci vůči standardním antituberkulotikům. Kombinace aktivity vůči HIV a *M. tuberculosis* je unikátní vlastností kalanolidu A, která umožňuje jeho použití u pacientů infikovaných jak virem HIV, tak i tuberkulózou (113).

Janin a kol., 2007 udávají další struktury, u kterých byl nalezena antimykobakteriální aktivita, ale doposud nebyla objasněna podstata jejich účinku.



Obrázek 82: Potenciální antituberkulotika s neobjasněným mechanismem účinku (48)

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Optimalizace reakčních podmínek pro syntézu 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů odvozených od *N*-benzylsalicylamidů
2. Příprava série *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů
3. Dokončení syntézy série *N*-(4-alkylfenyl)salicylamidů, z nich odvozených 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)dionů a odpovídajících 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů
4. Zpracování výsledků antibakteriálního a antifungálního testování antimykobakteriálně aktivních *N*-benzylthiosalicylamidů
5. Příprava nových *S*-benzylisothiosemikarbazonů
6. Příprava hybridních molekul cholesterolu a terpenů
7. V rámci studijního pobytu na Univerzitě Friedricha Schillera v Jeně nalézt další sloučeniny, které by mohly sloužit jako potenciální antituberkulotika
8. Výzkum vlastností u připravených sloučenin doplnit o studium lipofility, a to jednak experimentálně ze studií tenkovrstvé chromatografie a jednak výpočty log *P*

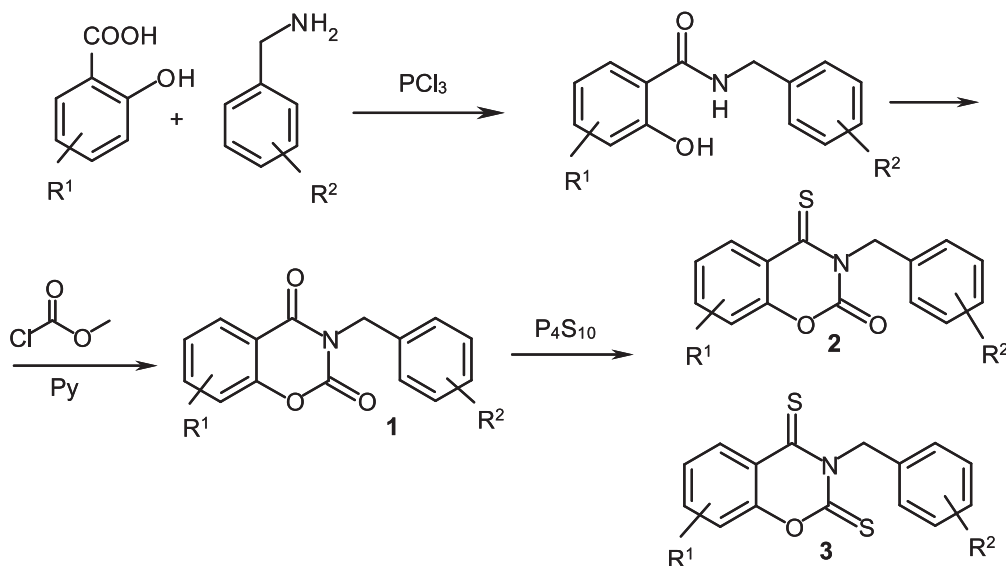
4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Monosirné a disirné deriváty 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., KLIMEŠOVÁ, V., KUNEŠ, J., PALÁT, K., KAUSTOVÁ, J., DAHSE HM., MÖLLMANN, U.: A Note to the Biological Activity of Benzoxazine Derivatives Containing the Thioxo Group. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, vol. 45, p. 2719–2725.

Cílem této práce bylo připravit deriváty 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu, u kterých je pouze jedna nebo obě oxoskupiny nahrazeny thioxoskupinou. Výzkum navazuje na disertační práci Peřiny, 2003 (114), kterému se v některých případech nepodařilo připravit disirné deriváty. Mým úkolem bylo nalézt vhodné reakční podmínky pro syntézu těchto chybějících disirných derivátů.

Syntéza (Obr. 83)



Obrázek 83: Syntéza sirných derivátů 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu

Metoda A: 3,5 mmol vysušeného výchozího benzoxazindionu bylo smíseno s 3,8 mmol sulfidu fosforečného a jemně rozetřeno. Směs byla pod vzdušným chladičem na kovové lázni zahřívána při teplotě 180–190 °C do zčervenání. Teplota byla udržována po dobu 20 min. Do mírně ochlazené reakční směsi byl přidán 10% roztok uhličitanu sodného. Vzniklá suspenze

byla odfiltrována a vysušena. Byla tak získána směs monosirného a disirného derivátu, která byla rozdělena na chromatografické koloně. Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a acetonu (3:1). Oba produkty byly po sloupcové chromatografii rekrystalizovány z ethanolu.

Metoda A selhala v případě většiny 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů. K přípravě těchto derivátů bylo nutné provést určité modifikace reakčních podmínek. Nejvyšší efektivity jsme dosáhli zvýšením obsahu sulfidu fosforečného na 10,1 mmol, zvýšením reakční teploty na 200–210 °C a prodloužením reakční doby až na 40 min (**metoda B**). Postup izolace produktů z reakční směsi zůstal zachován.

Metoda B byla úspěšná z hlediska přípravy 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů a vedla zároveň i ke zvýšení výtěžku u 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Porovnání výtěžků u metody A a metody B

označení v publikaci	R ¹	R ²	3-benzyl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3- benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on		3-benzyl-2 <i>H</i> -1,3- benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion	
			výtěžek (%)			
			metoda A	metoda B	metoda A	metoda B
e	6-Cl	4-F	24	34	nepřipraven	30
f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	24	34	nepřipraven	51
g	H	3,4-Cl ₂	24	52	nepřipraven	42
h	6-Br	3,4-Cl ₂	23	30	nepřipraven	43
i	6-Cl	3,4-Cl ₂	21	27	nepřipraven	42

Antimykobakteriální aktivita

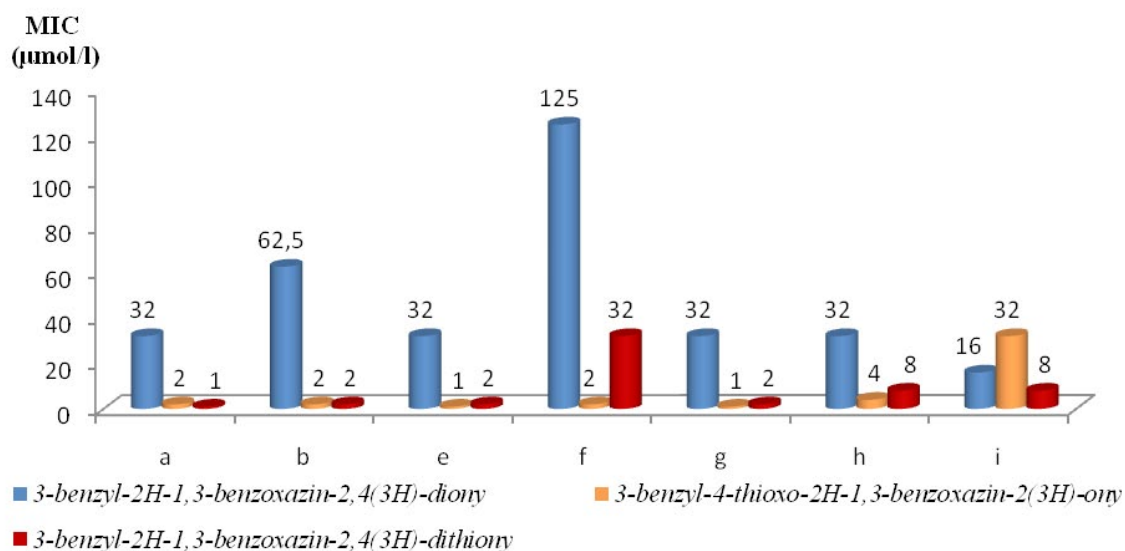
U všech derivátů byla hodnocena jejich biologická aktivita proti kmenům *M. tuberculosis* (My 331/88), *M. avium* (My 330/88) a dvěma kmenům *M. kansasii* (My 235/80 a 6509/96) (Tabulka 2).

Bylo zjištěno, že testované sloučeniny vykazují antimykobakteriální aktivitu srovnatelnou s INH, který byl použit jako standard. Porovnání s výchozími 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony zároveň ukazuje, že zavedení síry do molekuly významně zvyšuje biologickou aktivitu. Antimykobakteriální aktivita vzrůstá při záměně jedné oxoskupiny za thioxoskupinu (monosirné deriváty), záměna i druhé oxoskupiny (disirné deriváty) již k dalšímu výraznému zvýšení biologické aktivity nevede (Obr. 84).

Tabulka 2: Antimykobakteriální aktivita

		MIC (μmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96	
2a	H	H	1 / 2	8/8	4/8	4/8
2b	6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
2c	6-Cl	H	1/2	4/8	8/8	4/4
2d	6-CH ₃	H	1/1	2/2	1/2	1/2
2e	6-Cl	4-F	1/1	4/4	4/8	4/4
2f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	2/2	4/4	16/16	16/16
2g	H	3,4-Cl ₂	1/1	1/1	2/4	2/4
2h	6-Br	3,4-Cl ₂	2/4	8/8	16/16	16/16
2i	6-Cl	3,4-Cl ₂	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
3a	H	H	1/1	1/1	2/2	1/2
3b	6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
3c	6-Cl	H	n/n	n/n	n/n	n/n
3d	6-CH ₃	H	n/n	n/n	n/n	n/n
3e	6-Cl	4-F	1/2	8/16	8/16	8/16
3f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
3g	H	3,4-Cl ₂	1/2	0,5/0,5	4/4	4/4
3h	6-Br	3,4-Cl ₂	4/8	16/16	16/32	16/32
3i	6-Cl	3,4-Cl ₂	4/8	16/32	32/32	32/32
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

n: MIC se pro nízkou rozpustnost sloučeniny nepodařilo stanovit

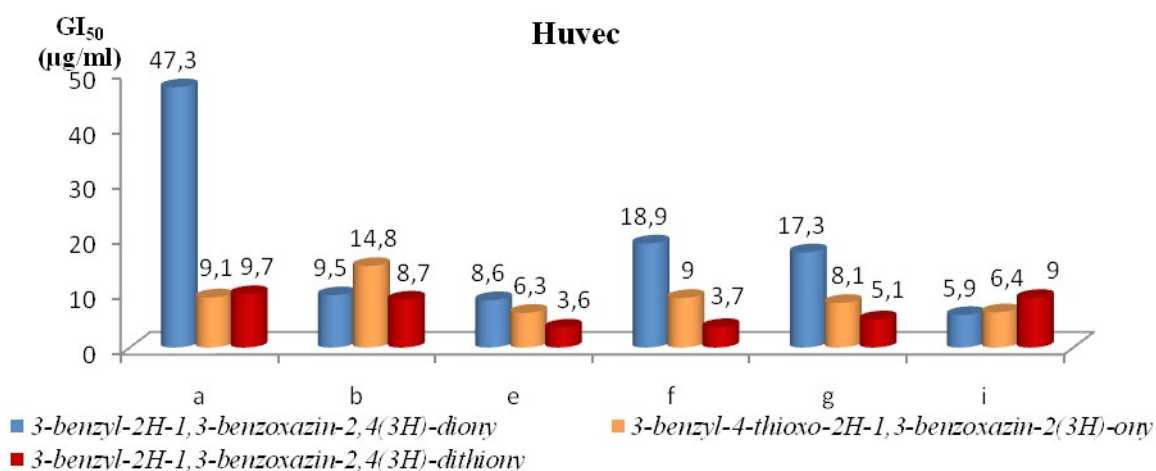


Obrázek 84: Biologická aktivita proti kmenu *M. tuberculosis* (My 331/88) (21 dní); hodnoty MIC benzoxazindionů převzaty z lit. Peřina, 2003 (114)

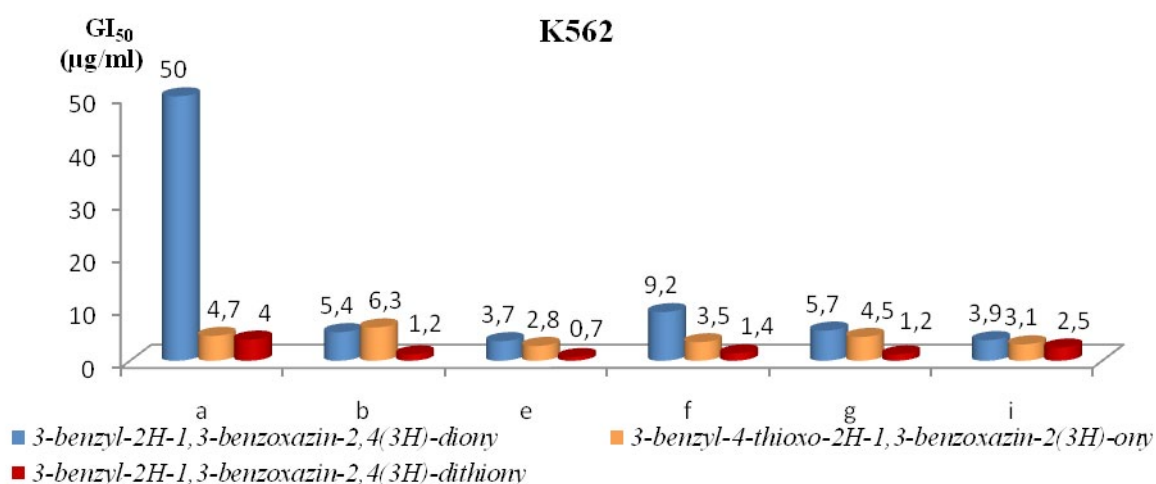
Antiproliferativní aktivita a cytotoxicita

U všech derivátů byla hodnocena i jejich antiproliferativní aktivita a cytotoxicita. Toto hodnocení probíhalo ve spolupráci s německým pracovištěm – Leibnitzův institut pro výzkum přírodních látek a infekční biologie – Hans Knoell Institut, Jena.

Ke stanovení antiproliferativní aktivity byly použity buňky lidské chronické myeloidní leukémie (K562) a buňky endotelové vény lidského pupečníku (HUVEC). Vyhodnocována byla koncentrace, která je ve srovnání s kontrolou potřebná k redukci růstu ošetřených buněk na polovinu (GI_{50} ; $\mu\text{g/ml}$) (Obr. 85 a 86).

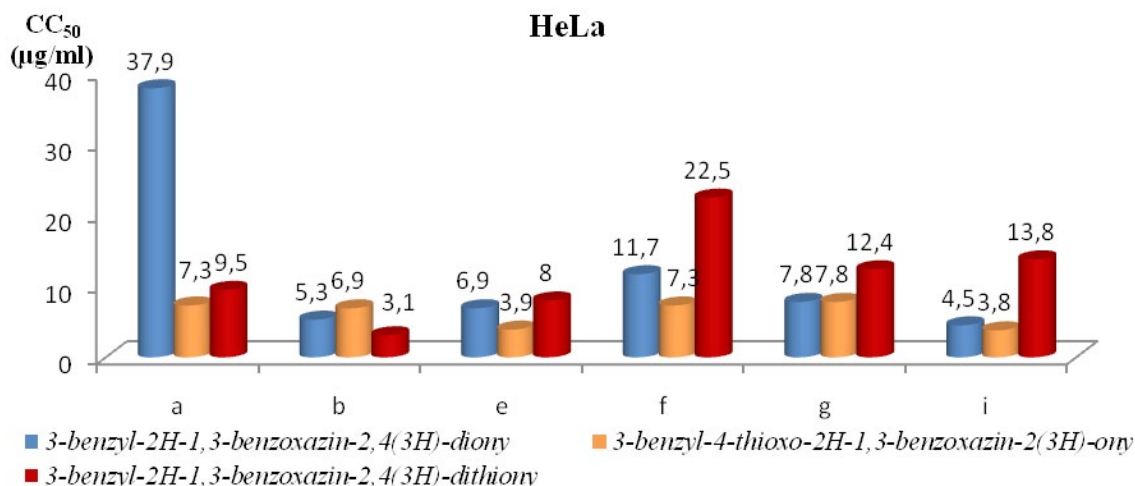


Obrázek 85: Antiproliferativní aktivita. Huvec



Obrázek 86: Antiproliferativní aktivita. K562

Pro určení cytotoxicity byly použity HeLa buňky. Jedná se o buňky lidské rakoviny děložního hrdla a vyhodnocována byla IC_{50} , tedy koncentrace, kdy u 50 % buněčné populace dochází ke specifické destrukci projevující se jako lyze buněk ve srovnání s kontrolou (Obr. 87). Na základě provedených výzkumů bylo zjištěno, že sloučeniny vykazují jak antiproliferativní aktivitu, tak i určitý stupeň cytotoxicity. Jelikož k testování vedlejších účinků byly použity rakovinné buněčné linie, plánujeme do další fáze výzkumu zařadit i linie zdravých buněk.



Obrázek 87: Cytotoxicita. HeLa

Jelikož 3-(3,4-dichlorbenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on a 3-(3,4-dichlorbenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-dithion vykazují nejvyšší antimykobakteriální aktivitu a zároveň hodnoty jejich IC_{50} a GI_{50} patří v rámci testovaných sloučenin spíše k těm středním, lze tyto sloučeniny vybrat k dalšímu testování na zdravých buněčných liniích.

Podíl na publikaci

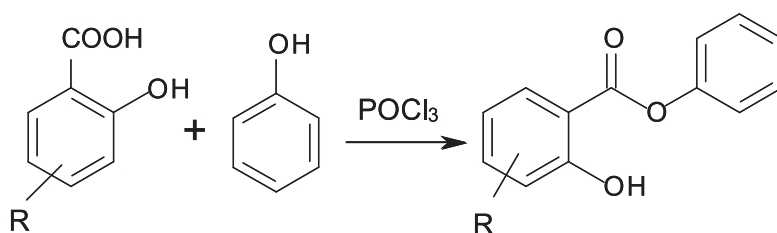
- 1) Optimalizace reakčních podmínek a příprava 3-(benzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-dithionů (metoda B).
- 2) Příprava 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů ve vyšším výtěžku než v případě metody A (Tabulka 1).
- 3) Zpracování výsledků do uceleného publikačního výstupu.

4.2. Syntéza, antibakteriální aktivita, antifungální aktivita a výzkum lipofility fenylesterů substituované kyseliny salicylové

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., KUNEŠ, J., BUCHTA, V., JÍLEK, P., STOLAŘÍKOVÁ, J.: Synthesis, Antibacterial Activity, Antifungal Activity and the Lipophilicity Study of Phenyl Salicylates, připravováno k publikování.

Fenylestery kyseliny salicylové, připravené reakcí substituované kyseliny salicylové s fenolem v přítomnosti chloridu fosforylu (Obr. 88), byly použity jako meziprodukty k syntéze *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů a *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů (kapitola 4.3). Jelikož je nesubstituovaný fenylester kyseliny salicylové již dlouho dobře znám pro své antiseptické a antimikrobiální vlastnosti, rozhodli jsme se prozkoumat antibakteriální a antifungální vlastnosti těchto sloučenin.

Syntéza (Obr. 88)



Obrázek 88: Syntéza fenylesterů kyseliny salicylové

Fenylestery kyseliny salicylové byly připraveny zahříváním kyseliny salicylové (1 mol) s fenolem (1 mol) v přítomnosti chloridu fosforylu (0,38 mol) při 70–80 °C pod zpětným chladičem (115). Teplota reakce byla udržována po dobu 4 hodin. Do ochlazené reakční směsi byl přidán 10% roztok uhličitanu sodného. Vzniklá suspenze byla odfiltrována, promyta čtyřikrát 20 ml vody a výsledný produkt byl získán krystalizací z ethanolu.

Stanovení fyzikálních vlastností

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Vzorky k analýze a biologickému hodnocení byly sušeny 12 hodin nad oxidem fosforečným při tlaku 66 Pa a teplotě 68 °C. Elementární analýza byla provedena na C, H, N, S – analyzátoru FISON S AE 1110

(Milano). Infračervená spektra byla změřena v KBr na přístroji NICOLET IMPACT 400. NMR spektra byla změřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300, pracujícím při 300 MHz pro ^1H a 75 MHz pro ^{13}C . Jako rozpouštědlo pro měření NMR byl použit DMSO.

Připravené deriváty

Fenylester kyseliny 3-methylsalicylové (2), výtěžek 64 %, t.t. 42–43 °C, IR (v CO) 1685 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,54 (1H, bs, OH), 7,93–7,86 (1H, m, H6), 7,56–7,44 (3H, m, H4, H3', H5'), 7,38–7,27 (3H, m, H2', H4', H6'), 6,94 (1H, t, $J=7,7$ Hz, H5), 2,22 (3H, s, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 168,6, 159,5, 150,1 137,4, 129,8, 128,1, 126,6, 126,4, 122,1, 119,4, 111,4, 15,6; Anal. vyp. pro C₁₄H₁₂O₃ (228,25): C 73,67; H 5,30 %; Nalezeno: C 73,53; H 5,48 %.

Fenylester kyseliny 3-methoxysalicylové (3), výtěžek 56 %, t.t. 67–69 °C, IR (v CO) 1684 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,15 (1H, bs, OH), 7,60–7,43 (3H, m, H6, H3', H5'), 7,36–7,26 (4H, m, H4, H2', H4', H6'), 6,95 (1H, t, $J=8,0$ Hz, H5), 3,83 (3H, s, OCH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167,4, 150,8, 150,3, 148,6, 129,8, 126,4, 122,1, 121,7, 119,2, 117,6, 113,4, 56,2; Anal. vyp. pro C₁₄H₁₂O₄ (244,25): C 68,85; H 4,95 %; Nalezeno: C 68,47; H 5,03 %.

Fenylester kyseliny 4-methylsalicylové (4), výtěžek 52 %, t.t. 43–44 °C, IR (v CO) 1684 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,25 (1H, bs, OH), 7,89 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H6), 7,52–7,42 (2H, m, H3', H5'), 7,36–7,25 (3H, m, H2', H4', H6'), 6,90–6,81 (2H, m, H3, H5), 2,49 (3H, s, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167,3, 160,7 150,3, 147,5, 130,7, 129,8, 126,4, 122,2, 120,9, 117,9, 110,2, 21,6; Anal. vyp. pro C₁₄H₁₂O₃ (228,25): C 73,67; H 5,30 %; Nalezeno: C 73,70; H 5,51 %.

Fenylester kyseliny 4-chlorsalicylové (5), výtěžek 54 %, t.t. 49–52 °C, IR (v CO) 1672 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,47 (1H, bs, OH), 8,04 (1H, d, $J=2,5$ Hz, H3), 7,70 (1H, dd, $J=8,8$ Hz, $J=2,5$ Hz, H5), 7,53–7,42 (2H, m, H3', H5'), 7,36–7,26 (3H, m, H2', H4', H6'), 7,02 (1H, d, $J=8,8$ Hz, H6); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,7, 160,7, 150,3, 139,9, 132,8, 129,8, 126,4, 122,1, 119,9, 117,5, 113,2; Anal. vyp. pro C₁₃H₉ClO₃ (248,67): C 62,79; H 3,65 %; Nalezeno: C 62,97; H 3,80 %.

Fenylester kyseliny 4-methoxysalicylové (6), výtěžek 51 %, t.t. 57 °C, IR (ν CO) 1672 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,50 (1H, bs, OH), 7,94 (1H, d, *J*=8,8 Hz, H6), 7,51–7,42 (2H, m, H3', H5'), 7,36–7,23 (3H, m, H2', H4', H6'), 6,63–6,57 (2H, m, H3, H5), 3,83 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167,4 165,9, 163,2, 150,3, 132,3, 129,8, 126,3, 122,2, 107,9, 105,2, 101,3, 55,9; Anal. vyp. pro C₁₄H₁₂O₄ (244,25): C 68,85; H 4,95 %; Nalezeno: C 68,88; H 4,99 %.

Fenylester kyseliny 5-fluorsalicylové (7), výtěžek 43 %, t.t. 84–85 °C, IR (ν CO) 1679 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,20 (1H, bs, OH), 7,72 (1H, dd, *J*=9,1 Hz, *J*=3,3 Hz, H6), 7,54–7,41 (3H, m, H4, H3', H5'), 7,37–7,27 (3H, m, H2', H4', H6'), 7,07 (1H, dd, *J*=9,1 Hz, *J*=4,4 Hz, H3); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,7 (d, *J*=2,9 Hz), 156,5, 154,8 (d, *J*=236,2 Hz), 150,3, 129,8, 126,5, 123,3 (d, *J*=23,5 Hz), 122,1, 119,4 (d, *J*=7,8 Hz), 116,2 (d, *J*=24,4 Hz), 114,2 (d, *J*=7,5 Hz); Anal. vyp. pro C₁₃H₉FO₃ (232,21): C 67,24; H 3,91 %; Nalezeno: C 67,00; H 3,77 %.

Fenylester kyseliny 5-chlorsalicylové (8), výtěžek 67 %, t.t. 95–97 °C, IR (ν CO) 1685 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,45 (1H, bs, OH), 8,93 (1H, d, *J*=2,8 Hz, H6), 7,59 (1H, dd, *J*=8,8 Hz, *J*=2,8 Hz, H4), 7,53–7,42 (2H, m, H3', H5'), 7,36–7,26 (3H, m, H2', H4', H6'), 7,07 (1H, d, *J*=8,8 Hz, H3); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,2, 158,6, 150,3, 135,4, 130,1, 129,8, 126,4, 122,9, 122,1, 119,9, 115,6; Anal. vyp. pro C₁₃H₉ClO₃ (248,67): C 62,79; H 3,65 %; Nalezeno: C 62,90; H 3,81 %.

Fenylester kyseliny 5-bromsalicylové (9), výtěžek 40 %, t.t. 112–113 °C, IR (ν CO) 1692 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,47 (1H, bs, OH), 8,04 (1H, d, *J*=2,5 Hz, H6), 7,70 (1H, dd, *J*=8,8 Hz, *J*=2,5 Hz, H4), 7,53–7,42 (2H, m, H3', H5'), 7,36–7,26 (3H, m, H2', H4', H6'), 7,02 (1H, d, *J*=8,8 Hz, H3); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,1, 159,0, 150,3, 138,2, 133,0, 129,8, 126,4, 122,1, 120,2, 116,2, 110,2; Anal. vyp. pro C₁₃H₉BrO₃ (293,12): C 53,27; H 3,09 %; Nalezeno: C 53,42; H 2,96 %.

Fenylester kyseliny 3,5-dibromsalicylové (10), výtěžek 47 %, t.t. 36–39 °C, IR (ν CO) 1690 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,85 (1H, bs, OH), 8,18 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H6), 8,13 (1H, d, *J*=2,2 Hz, H4), 7,54–7,44 (2H, m, H3', H5'), 7,39–7,29 (3H, m, H2', H4', H6');

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165,8, 156,1, 150,1, 140,7, 132,2, 129,8, 126,7, 122,0, 116,2, 113,0, 110,8; Anal. vyp. pro $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}_3$ (372,01): C 41,97; H 2,17 %; Nalezeno: C 42,29; H 1,80 %.

Antimykobakteriální aktivita

Testování antimykobakteriální aktivity bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. Hodnocení bylo provedeno in vitro na kmenech z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Jednalo se o kmeny *M. tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88 a o dva kmeny *M. kansasii* My 235/80 a 6509/96. Kmen *M. kansasii* 6509/96 byl izolován z klinického vzorku pacienta. Antimykobakteriální aktivita látek byla stanovena na Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha). Látky byly rozpuštěny v DMSO, stupnice výsledné koncentrace byla 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2 a 1 $\mu\text{mol/l}$. Minimální inhibiční koncentrace byla stanovena po 14 a 21 dnech při inkubaci 37 °C. Jedná se o nejnižší koncentraci testované látky, při které dochází k inhibici růstu. Jako standard bylo použito antituberkulotikum isoniazid.

Antibakteriální aktivita

Antibakteriální hodnocení bylo provedeno na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. K biologickým testům byly použity jednak bakteriální kmeny pocházející z České sbírky mikroorganismů (Brno), jednak bakterie klinicky izolované (Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Hradci Králové). Ze sbírkových kmenů byla aktivita testována proti kmenům *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Klinicky izolovány byly kmeny *S. aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní, *S. epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 a *K. pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní.

Ke zjištění antibakteriální aktivity byla zvolena mikrodiluční bujonová metoda v destičkách. Jako kultivační médium byl použit Mueller-Hintonův bujon (Difko/Becton Dickinson, Detroit, MI). Testované sloučeniny byly přidávány k médiu v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 a 0,98 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena po 24 a 48 hodinách inkubace při 35 °C. Jako standard byla použita antibiotika neomycin, penicilin G, fenoxymethylpenicilin a ciprofloxacin.

Antifungální aktivita

Antifungální hodnocení bylo provedeno na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Z houbových organismů byly do testů zařazeny *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445.

K hodnocení antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách M27-A-M1. Jako živné médium bylo zvoleno RPMI 1640 s glutaminem (Sevapharma, Praha) a upraveno na pH 7,0 pomocí 0,165M morfolinpropan-1-sulfonové kyseliny. Minimální inhibiční koncentrace MIC byla stanovena po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě, v humidní atmosféře při teplotě 35 °C. U kmene *T. mentagrophytes* byla MIC vyhodnocena po 72 a 120 hodinách. Testované sloučeniny byly přidávány k médiu v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 a 0,98 μmol/l. Flukonazol byl do testování zařazen jako standard pro porovnání aktivit jednotlivých derivátů.

Výsledky testování

Fenylestery substituované kyseliny salicylové vykazovaly aktivitu pouze proti mykobakteriím a i tato aktivita byla spíše střední až nízká. Přehled antimykobakteriální aktivity je uveden v tabulce 10 (kapitola 4.3). Nejvíce aktivním derivátem byl fenylester kyseliny 4-methoxysalicylové s minimální inhibiční koncentrací 8 μmol/l vůči *M. tuberculosis* (inkubační doba 14 dní).

Studium lipofility

Lipofilitu fenylsalicylátů jsme studovali pomocí RP-TLC. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr (pH = 7,4) s různým obsahem acetonu. Koncentrace acetonu byla volena 80, 75, 70, 65 a 50 %. R_M byly z experimentálně získaných retenčních faktorů R_F vypočítány podle rovnice: $R_M = \log(1/R_F - 1)$ (Tabulka 3).

Rovnice dle Soczewinskiho-Wachtmeistera prokázaly lineární závislost mezi hodnotami R_M a složením mobilní fáze (Pearsonův korelační koeficient se pohyboval v rozmezí -0,985 až -0,993) (Tabulka 4).

V další fázi byla vyšetřována vzájemná závislost mezi hodnotami R_M^0 získanými extrapolací na nulový obsah acetonu a rozdělovacími koeficienty $\log P$, které byly vypočítány pomocí

několika softwarových programů. Jednalo se o freewarové produkty ALOGPs, ACD logP, AB/logP, MiLogP, ALOGP, MLOGP, KowWIN, XLOGP₂ a XLOGP₃, které lze nalézt na internetu (116, 117). K výpočtu log *P* byl použit i komerčně dostupný ChemBioDraw Ultra 11.0.

Tabulka 3: Přehled fenylesterů kyseliny salicylové zařazených do studia lipofility a jejich R_M hodnoty pro různou koncentraci acetonu

		R_M					
		aceton (%)					
		80	75	70	65	60	50
1	H	-0,25	-0,02	0,14	0,45	0,55	0,91
2	3-CH ₃	-0,18	0,10	0,25	0,58	0,66	1,12
3	3-OCH ₃	-0,37	-0,09	0	0,31	0,37	0,69
4	4-CH ₃	-0,18	0,09	0,23	0,55	0,6	1,00
5	4-Cl	-0,18	0,10	0,25	0,63	0,72	1,12
6	4-OCH ₃	-0,29	-0,05	0,12	0,45	0,52	0,91
7	5-F	-0,23	0,03	0,18	0,45	0,55	1,00
8	5-Cl	-0,18	0,09	0,25	0,6	0,69	1,12
9	5-Br	-0,16	0,1	0,29	0,63	0,72	1,19
10	3,5-Br ₂	-0,02	0,29	0,48	0,79	0,95	1,38

Tabulka 4: Lineární závislost mezi hodnotami R_M a složením mobilní fáze

		rovnice dle Soczewinskiho-Wachtmeistera			
		$R_M = b \cdot c + R_M^0$			
		r	s	F	n
1	$R_M = -0,038 c + 2,876$	-0,993	0,054	302,22	6
2	$R_M = -0,042 c + 3,239$	-0,987	0,083	150,32	6
3	$R_M = -0,034 c + 2,408$	-0,985	0,073	128,05	6
4	$R_M = -0,038 c + 2,966$	-0,988	0,072	169,04	6
5	$R_M = -0,042 c + 3,266$	-0,989	0,077	177,79	6
6	$R_M = -0,038 c + 2,876$	-0,993	0,062	242,94	6
7	$R_M = -0,042 c + 3,239$	-0,987	0,075	161,65	6
8	$R_M = -0,034 c + 2,408$	-0,985	0,064	260,25	6
9	$R_M = -0,038 c + 2,966$	-0,988	0,062	301,45	6
10	$R_M = -0,042 c + 3,266$	-0,989	0,09	149,61	6

Nejvyšší vzájemná závislost byla nalezena mezi R_M^0 a hodnotami MiLogP (Pearsonův korelační koeficient $r = 0,93$) (Tabulka 5). Hodnoty log *P* vypočítané pomocí jednotlivých softwarových produktů jsou uvedeny v tabulce 6 na konci kapitoly.

Abychom mohli studovat příspěvky lipofility jednotlivých substituentů, zařadili jsme do naší studie i fenylester nesubstituované kyseliny salicylové (salol). Hodnoty ΔR_M^0 byly vypočítány podle rovnice $\Delta R_M^0 = \Delta R_{MX}^0 - \Delta R_{MH}^0$; kde ΔR_{MX}^0 je substituovaný fenylester a ΔR_{MH}^0 představuje nesubstituovaný salol (Tabulka 7).

Vzájemnou závislost mezi hodnotami ΔR_M^0 a lipofilními parametry π vyjadřuje následující rovnice:

$$\Delta R_M^0 = 0,733(\pm 0,187) \pi - 0,118(\pm 0,111)$$

$$r = 0,81, s = 0,215, F = 15,30, n = 10$$

Tabulka 5: Collanderovy rovnice

	Collanderova rovnice	r	s	F	n
ALOGPs	$\log P = 0,750 R_M^0 + 1,605$	0,85	0,168	21,6	10
ACDlogP	$\log P = 1,200 R_M^0 - 0,253$	0,89	0,231	29,2	10
AB/logP	$\log P = 1,6788 R_M^0 - 1,418$	0,88	0,331	27,83	10
miLogP	$\log P = 1,314 R_M^0 + 0,132$	0,93	0,185	54,87	10
ALOGP	$\log P = 1,118 R_M^0 - 0,219$	0,88	0,235	27,76	10
MLogP	$\log P = 1,070 R_M^0 + 0,452$	0,89	0,199	31,22	10
KowWIN	$\log P = 1,455 R_M^0 - 0,177$	0,91	0,251	36,32	10
XLOGP ₂	$\log P = 1,274 R_M^0 + 0,580$	0,86	0,283	21,97	10
XLOGP ₃	$\log P = 1,020 R_M^0 + 1,146$	0,87	0,214	24,66	10
Chem BioDraw Ultra 11.0	$\log P = 1,361 R_M^0 - 0,644$	0,88	0,271	27,32	10

Tabulka 7: R_M^0 , ΔR_M^0 a lipofilní parametry π

		R_M^0	ΔR_M^0	π
1	H	2,88	0,00	0,00
2	3-CH ₃	3,24	0,36	0,52
3	3-OCH ₃	2,41	-0,47	0,12
4	4-CH ₃	2,97	0,09	0,60
5	4-Cl	3,27	0,39	0,73
6	4-OCH ₃	2,94	0,06	-0,03
7	5-F	2,97	0,10	0,22
8	5-Cl	3,27	0,39	0,77
9	5-Br	3,41	0,53	0,58
10	3,5-Br ₂	3,67	0,79	1,16

Podíl na publikaci

Tato práce patřila k mým samostatným úkolům.

Tabulka 6: Hodnoty $\log P$ vypočítané pomocí různých softwarů a R_M^0

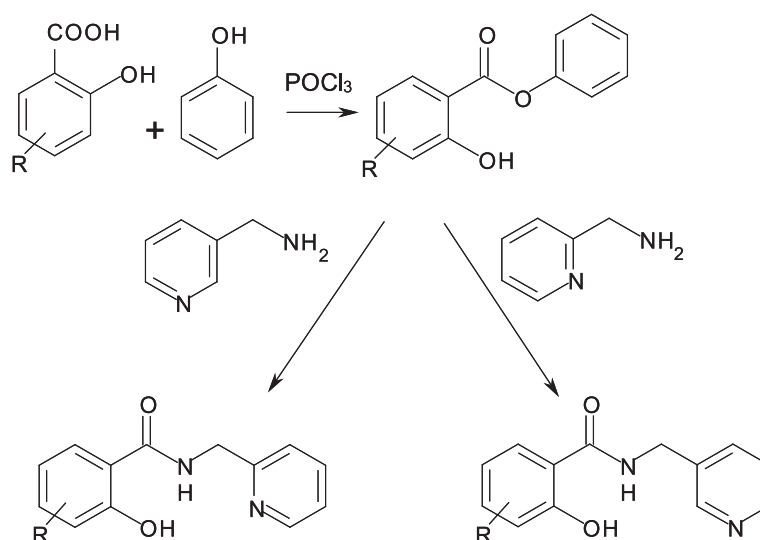
R_M^0	Log P										
	ALOGPs	ACD logP	AB/Log P	miLogP	ALOGP	MLOGP	KowWIN	XLOGP ₂	XLOGP ₃	ChemBioDraw	
1	2,876	3,58	3,09	3,21	3,83	2,99	3,46	3,82	4,10	3,83	3,13
2	3,239	3,88	3,40	3,62	4,02	3,48	3,72	4,37	4,33	4,74	3,62
3	2,408	3,63	2,98	3,11	3,43	2,98	3,18	3,65	4,02	3,82	3,00
4	2,966	3,91	3,40	3,62	4,25	3,48	3,72	4,37	4,54	4,32	3,62
5	3,266	4,19	3,70	3,99	4,48	3,66	3,99	4,46	4,72	4,46	3,69
6	2,936	3,63	2,98	3,10	3,86	2,98	3,18	3,90	4,02	3,93	3,00
7	2,973	3,75	3,15	3,48	3,97	3,20	3,86	4,02	4,26	3,93	3,29
8	3,27	4,19	3,70	4,27	4,48	3,66	3,99	4,46	4,72	4,66	3,69
9	3,41	4,05	3,79	4,28	4,61	3,74	4,12	4,71	4,90	4,52	3,96
10	3,666	4,52	4,49	5,20	5,14	4,49	4,50	5,60	5,70	4,91	4,79

4.3. *N*-(2-Pyridylmethyl)salicylamidy a *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidy

PETRLÍKOVÁ E., WAISSER, K., PALÁT, K., KUNEŠ, J., KAUSTOVÁ, J.: New Group of Potential Antituberculotics: *N*-(2-Pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-Pyridylmethyl)salicylamides. *Chem. Pap.*, under review.

Tento výzkum také navazuje na výzkum *N*-benzylsalicylamidů (114), které patří ke středně aktivním antimykobakteriálním sloučeninám. Stanovení jejich biologické aktivity však značně ztěžuje jejich velmi nízká rozpustnost v testovacím médiu. Na základě předpokladu, že lepší rozpustnosti lze dosáhnout nahrazením benzylové části, byly pro testování antimykobakteriální aktivity navrženy *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidy a *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidy.

Syntéza



Obrázek 89: Syntéza *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů

N-Benzylsalicylamidy byly připraveny reakcí kyseliny salicylové s benzylaminem v přítomnosti chloridu fosforitého. Tato metoda se však v případě *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů a *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů ukázala jako neúspěšná. Pro přípravu heterocyklických salicylamidů musel být použit postup s fenylesterem kyseliny salicylové a aminoheterocyklem (Obr. 89). *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidy se podařilo připravit tavením fenylesteru kyseliny salicylové s 3-pikolylnaminem při teplotě 190 až 210 °C po dobu 90 minut.

N-(2-Pyridylmethyl)salicylamidy se za těchto podmínek v reakční směsi rozkládaly a pro jejich syntézu bylo nutné zajistit nižší reakční teplotu (70–90 °C) a reakční dobu prodloužit na 180 minut.

Studium intramolekulárních vodíkových vazeb

Pomocí infračervené spektroskopie byly studovány intramolekulární vodíkové vazby mezi vodíkem hydroxylové skupiny a karbonylem. Na základě vlnočtů hydroxylů $\nu(\text{OH})$ byla vypočítána délka těchto vodíkových vazeb. Jako standard, vůči kterému byly $\nu(\text{OH})$ jednotlivých sloučenin vztaženy, byl zvolen fenol ($\nu(\text{OH}) = 3611 \text{ cm}^{-1}$). U *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů byl rozdíl vlnočtů $\Delta\nu(\text{OH})$ 204–222 cm^{-1} a u *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů 142–185 cm^{-1} . Čím kratší je zjištěná vzdálenost mezi vodíkem a kyslíkem, tím lze usuzovat na silnější interakci. Vodíkové vazby u *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů jsou obecně kratší a tím i pevnější než u *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů.



Obrázek 90: 3D-modely 4-methyl-*N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidu a 4-methyl-*N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidu

Pro 4-methyl-*N*-(2-pyridylmethyl)salicylamid, 4-methyl-*N*-(3-pyridylmethyl)salicylamid a byly vytvořeny 3D-modely (Obr. 90). Další modely byly vytvořeny i pro 4-methyl-*N*-(2-pyridylmethyl)salicylamid a 4-methoxy-*N*-(2-pyridylmethyl)salicylamid (Tabulka 8 a 9).

Tabulka 8: Konformery 4-methyl-*N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidu

	2d	2d_A	2d_B
E_h (kJ/mol)	-2105992,17	-2105958,36	-2105958,81
λ (Å)	1,66071 2,13908	1,93131	1,97334 2,23179

E_h = celková energie, λ = délka vodíkových vazeb

Tabulka 9: Konformery 4-methoxy-*N*-(2-pyridinylmethyl)salicylamidu

	2c	2c_C	2c_A	2c_B
E_h (kJ/mol)	-2303487,47	-2303457,60	-2303476,49	-2303476,73
λ (Å)	1,64684 2,13788	2,06871 2,18585	2,01384 1,92950	2,02460 1,97948 2,23725

E_h = celková energie, λ = délka vodíkových vazeb

Antimykobakteriální aktivita

U fenylesterů kyseliny salicylové, *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů a *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů byla hodnocena jejich aktivita proti kmenům *M. tuberculosis* (My 331/88), *M. avium* (My 330/88) a dvěma kmenům *M. kansasii* (My 235/80 a 6509/96) (Tabulka 10, 11 a 12). Minimální inhibiční koncentrace *N*-benzylsalicylamidů byly převzaty z literatury (118) (Tabulka 13).

Tabulka 10: Antimykobakteriální aktivita fenylesterů kyseliny salicylové

		MIC (μmol/l)			
		Inkubační doba 14 d/21 d			
	R	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1a	3-CH ₃	62,5/125	250/500	250/500	250/250
1b	3-OCH ₃	125/500	250/1000	500/1000	250/500
1c	4-CH ₃	32/62,5	250/250	250/500	500/500
1d	4-OCH ₃	8/32	62,5/62,5	62,5/125	62,5/125
1e	4-Cl	16/62,5	62,5/125	62,5/250	62,5/250
1f	5-F	32/125	125/500	250/500	125/250
1g	5-Cl	62,5/125	250/500	500/500	250/500
1h	5-Br	62,5/125	125/250	250/500	125/250
1i	3,5-Cl ₂	250/500	1000/1000	500/500	250/500
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

Tabulka 11: Antimykobakteriální aktivita *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů

		MIC (μmol/l)			
		Inkubační doba 14 d/21 d			
	R	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
2b	3-CH ₃	62,5/62,5	125/250	250/500	250/250
2c	3-OCH ₃	250/250	1000/1000	500/1000	500/500
2d	4-CH ₃	62,5/125	250/500	250/500	250/250
2f	4-Cl	125/250	500/500	250/500	250/500
2g	5-F	500/1000	500/1000	500/1000	500/500
2h	5-Cl	125/250	125/250	500/500	250/250
2i	5-Br	250/500	250/250	125/250	125/250
2k	3,5-Br ₂	125/250	>250/>250	125/250	125/250
2b	3-CH ₃	62,5/62,5	125/250	250/500	250/250
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

Tabulka 12: Antimykobakteriální aktivita *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů

		MIC (μmol/l)			
		Inkubační doba 14 d/21 d			
	R	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
3a	H	500/500	500/500	250/500	250/500
3b	3-CH ₃	250/250	500/500	500/500	250/250
3c	3-OCH ₃	250/500	1000/1000	500/500	62,5/125
3d	4-CH ₃	250/500	500/1000	1000/1000	500/500
3e	4-OCH ₃	500/500	1000/1000	250/500	250/500
3f	4-Cl	125/250	250/250	250/500	250/500
3g	5-F	250n/500n	500n/500n	500n/500n	500/1000
3h	5-Cl	500/500	250n/250n	250n/500n	500/500
3i	5-Br	125/125	250n/250n	250/500	125/250
3j	3,5-Cl ₂	250/500	500n/500n	1000/1000	500/1000
3k	3,5-Br ₂	125/250	1000/1000	1000/1000	250/500
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

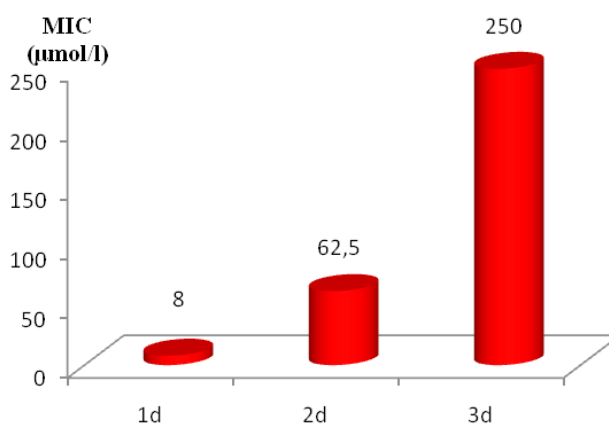
n: nárůst (nebylo možno přesně stanovit hodnotu MIC)

Porovnáním antimykobakteriální aktivity fenylesterů kyseliny salicylové, *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidů, *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidů a *N*-benzylsalicylamidů bylo zjištěno, že tato aktivita obecně klesá v řadě od *N*-benzylsalicylamidů přes *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidy k *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidům. *N*-Pyridylmethylsalicylamidy jsou také méně aktivní než fenylestery kyseliny salicylové (Obr. 91 a 92).

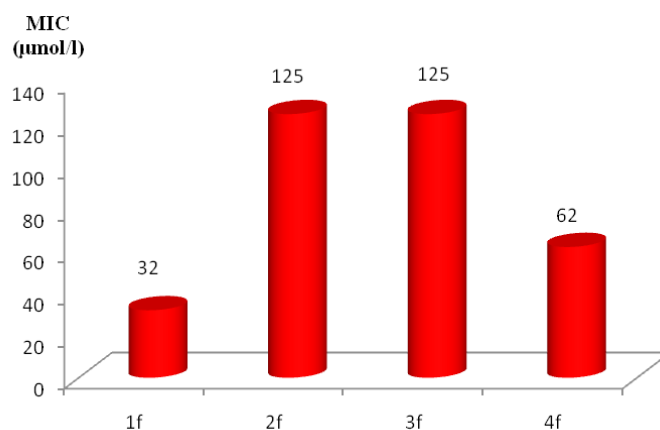
Tabulka 13: Antimykobakteriální aktivita N-benzylsalicylamidů. Hodnoty převzaty z literatury (118)

MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
Inkubační doba 14 d/21 d			
	R	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88
4a	H	n/n	125/125
4c	3-OCH ₃	n/n	n/n
4e	4-OCH ₃	125/n	125/n
4f	4-Cl	62/62	62/62
4h	5-Cl	62/n	n/n
4i	5-Br	n/n	n/n
4j	3,5-Cl ₂	32/62	125/125
4k	3,5-Br ₂	32/32	125/125
INH		1/1	>250/>250

n: MIC se pro nízkou rozpustnost sloučeniny nepodařilo stanovit



Obrázek 91: Porovnání aktivity proti *M. tuberculosis* (14 d) pro sloučeniny 1d, 2d a 3d



Obrázek 92: Porovnání aktivity proti *M. tuberculosis* (14 d) pro sloučeniny 1f, 2f, 3f a 4f

Vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou

Závislost minimální inhibiční koncentrace na $\log P$ byla zjišťována pro kmeny *M. tuberculosis* a *M. avium* (inkubační doba 14 dní). Na základě našich výpočtů bylo zjištěno, že antimykobakteriální aktivita vzrůstá s rostoucí lipofilitou vyjádřenou jako $\log P$ (ChemBioDraw) (Rovnice 1, 2). Indikátorovou proměnnou I_1 byly označeny *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidy a indikátorovou proměnnou I_2 *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidy.

$$\log \text{MIC}_{M.tbc 14} = -0,267 (\pm 0,089) \log P + 0,141 (\pm 0,163) I_1 + 0,246 (\pm 0,187) I_2 + 2,613 (\pm 0,310)$$

$$r = 0,81, s = 0,229, n = 23, F = 12,17 \quad (1)$$

$$\log \text{MIC}_{M.avium 14} = -0,025 (\pm 0,102) \log P + 0,450 (\pm 0,180) I_1 + 0,709 (\pm 0,221) I_2 + 2,116 (\pm 0,344)$$

$$r = 0,78, s = 0,262, n = 20, F = 8,03 \quad (2)$$

Vypovídací hodnota vypočítaných $\log P$ byla ověřována pomocí tenkovrstvé chromatografie (mobilní fáze 60% aceton s fosfátovým pufrem – pH 7,4) a mezi experimentálními hodnotami R_M a vypočítanými hodnotami $\log P$ byla zjištěna vzájemná závislost (Rovnice 3). R_M a $\log P$ jsou uvedeny v tabulce 14.

$$\log P = 2,64 (\pm 0,17) R_M + 1,41 (\pm 0,075)$$

$$r = 0,95, s = 0,260, n = 27, F = 225,81 \quad (3)$$

Tabulka 14: R_M a $\log P$ hodnoty

	R	log P	R_M		R	log P	R_M
2b	3-CH ₃	2,09	0,25	3g	5-F	1,34	0,11
2c	3-CH ₃ O	1,48	-0,12	3h	5-Cl	1,74	0,23
2d	4-CH ₃	2,09	0,12	3i	5-Br	2,01	0,21
2f	4-Cl	2,16	0,31	3j	3,5-Cl ₂	2,3	0,39
2g	5-F	1,76	0,1	3k	3,5-Br ₂	2,84	0,5
2h	5-Cl	2,16	0,23	4a	H	2,52	0,42
2i	5-Br	2,43	0,29	4c	3-CH ₃ O	2,39	0,31
2k	3,5-Br ₂	3,26	0,55	4e	4-CH ₃ O	2,39	0,42
3a	H	1,18	0,02	4f	4-Cl	3,08	0,65
3b	3-CH ₃	1,67	0,23	4h	5-Cl	3,08	0,65
3c	3-CH ₃ O	1,06	-0,16	4i	5-Br	3,53	0,65
3d	4-CH ₃	1,67	0,12	4j	3,5-Cl ₂	3,64	1,05
3e	4-CH ₃ O	1,06	-0,03	4k	3,5-Br ₂	4,18	0,95
3f	4-Cl	1,74	0,23				

Dosadíme-li do výpočtu R_M místo $\log P$, dostaneme rovnice 4 a 5.

$$\log \text{MIC}_{M.tb\ 14} = -0,688 (\pm 0,254) \log P + 0,072 (\pm 0,190) I_1 + 0,269 (\pm 0,194) I_2 + 2,249 (\pm 0,216)$$
$$r = 0,80, s = 0,236, n = 23, F = 11,13 \quad (4)$$

$$\log \text{MIC}_{M.avium\ 14} = -0,187 (\pm 0,275) \log P + 0,385 (\pm 0,198) I_1 + 0,643 (\pm 0,217) I_2 + 2,166 (\pm 0,224)$$
$$r = 0,78, s = 0,258, n = 20, F = 8,36 \quad (5)$$

Podíl na publikaci

Příprava a studium *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů patřila k mým samostatným úkolům. Na tomto výzkumu se nepodílel žádný jiný student. Vytvoření 3D-modelů, výpočet nejstabilnějších konformací a délky vodíkových vazeb je prací pana doktora Paláta.

4.4. Salicylanilidy

WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., VRABCOVÁ, P., KOLÁŘ, K., STOLAŘÍKOVÁ J.: The Antimycobacterial Salicylanilides, Inhibitors of ATP Synthesis. *Folia Pharm. Univ. Carol.* accepted.

Biologická aktivita salicylanilidů byla předmětem celé řady výzkumů. Jejich antibakteriální aktivita je známa od 50. let, kdy se ukázalo, že se jedná o sloučeniny účinné jak proti grampozitivním, tak i proti gramnegativním bakteriím. Další výzkumy prokázaly významné vlastnosti, jako je např. antiprotozoální, anthelmintická, cestodocidní, nematocidní, moluskocidní, neuroleptická a antimykobakteriální aktivita, která byla poprvé vyhodnocována již v roce 1963. 4',5-dichlorsalicylanilid byl dále používán k léčbě kožních onemocnění způsobené mykobakteriemi (119).

Několik prací se také zabývá mechanismem účinku salicylanilidů. V roce 1998 byly zveřejněny dvě práce vypracované v R. W. Johnsonově farmaceutickém výzkumném ústavu v New Jersey, USA. Jejich autoři předpokládají, že salicylanilidy působí jako inhibitory dvoukomponentového systému, a tím se tedy jejich účinek liší od účinku v současné době používaných antituberkulotik (120, 121). V roce 2003 byla zveřejněna práce podle níž salicylanilidy patří mezi potenciální inhibitory sekrečního systému u bakterie *Yersinia pseudotuberculosis* (122).

Waiser a kol. ve spolupráci s Institutem virologie Slovenské akademie věd v Bratislavě studovali mechanismus účinku u salicylanilidů. K testování byly použity myši EAC buňky (H Swiss albino mice). Cílem výzkumu bylo zjistit vliv testovaných sloučenin na respiraci EAC buněk. Na základě tohoto výzkumu bylo zjištěno, že testované deriváty mají skutečně vliv na respirační řetězec. Předpokládá se, že salicylanilidy působí podobně jako ostatní rozpojovače, jakými jsou např. dinitrofenol a karbonylkyanid-*p*-trifluormethoxyfenylhydrazon. Měření pomocí kyslíkové elektrody prokázalo, že salicylanilidy snižují hladinu ATP (123).

U salicylanilidů se předpokládá, že aniontová forma zachytí proton v extramitochondriálním prostoru, takto vzniklá neutrální molekula projde přes vnitřní mitochondriální membránu a v matrix mitochondrie dojde k uvolnění protonu. Salicylanilid se poté v podobě aniontu vrátí pasivním transportem zpět. Tímto způsobem dochází k ovlivnění protonmotivní síly nezbytné

pro oxidační fosforylaci (124). U salicylanilidů je to pravděpodobně právě hydroxylová skupina, která podmiňuje přerušení oxidační fosforylace. Pomocí hydroxylové skupiny dochází k přenosu protonu a po jeho odštěpení vzniká delokalizací stabilizovaný aniont (125).

Naším cílem bylo navázat na předchozí výzkum (123) a připravit sérii salicylanilidů k testování antimykobakteriální aktivity. Přehled antimykobakteriální aktivity je uveden v tabulce 15.

Tabulka 15: Antimykobakteriální aktivita salicylanilidů

		MIC (μmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96	
1	5-Br	ethyl	16/32 ^a	62,5/62,5 ^a	16/62,5 ^a	32/62,5 ^a
2	5-Cl	ethyl	8/8 ^a	n/na	8/8 ^a	16/16 ^a
3	4-Cl	ethyl	8/8 ^a	16/16 ^a	8/16 ^a	16/16 ^a
4	5-Br	isopropyl	8/8 ^b	16/32 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
5	5-Cl	isopropyl	8/8 ^b	16/32 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
6	4-Cl	isopropyl	8/8 ^b	8/16 ^b	8/16 ^b	16/16 ^b
7	5-F	isopropyl	8/32	8/32	16/16	16/16
8	4-CH ₃	isopropyl	62,5n/125n	250n/250n	125n/250n	125n/250n
9	5-Br	sek-butyl	4/8 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
10	5-Cl	sek-butyl	8/8 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
11	4-Cl	sek-butyl	8/8 ^b	8/8 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
12	5-F	sek-butyl	8/8	8/8	8/16	8/16
13	4-CH ₃	sek-butyl	250n/250n	250n/500n	500n/500n	250n/500n
14	5-Cl	butyl	4/4 ^a	8/8 ^a	8/8 ^a	4/8 ^a
15	5-Cl	terc-butyl	8/16 ^b	16/32 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
16	4-Cl	terc-butyl	16/16 ^b	n/nb	32/62,5 ^b	32/62,5 ^b
17	5-F	terc-butyl	8/8	8/16	16/16	8/16
18	4-CH ₃	terc-butyl	125n/250n	250n/500n	500n/500n	250n/250n
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

^aHusáková, 2008 (126), ^bDivišová, 2007 (127); n: nárůst (nebylo možné přesně stanovit hodnotu MIC)

Minimální inhibiční koncentrace salicylanilidů se pohybuje v rozmezí 4 až 62,5 μmol/l. Nejvíce aktivním derivátem je derivát 14 s aktivitou 4 až 8 μmol/l proti všem mykobakteriálním kmenům.

Podíl na publikaci

Připravila jsem sloučeniny 7, 12 a 17. Sloučeniny 8, 13 a 18 připravila pod mým vedením diplomantka Petra Vrabcová.

4.5. 3-(4-Alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony

PETRLÍKOVÁ E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., VRABCOVÁ, P., KUNEŠ, J., KOLÁŘ, K. STOLAŘÍKOVÁ, J.: Highly Active Antimycobacterial Derivatives of Benzoxazine. *Bioorg. Med. Chem.*, under review. (Do publikace nebyla zařazena antibakteriální a antifungální aktivita.)

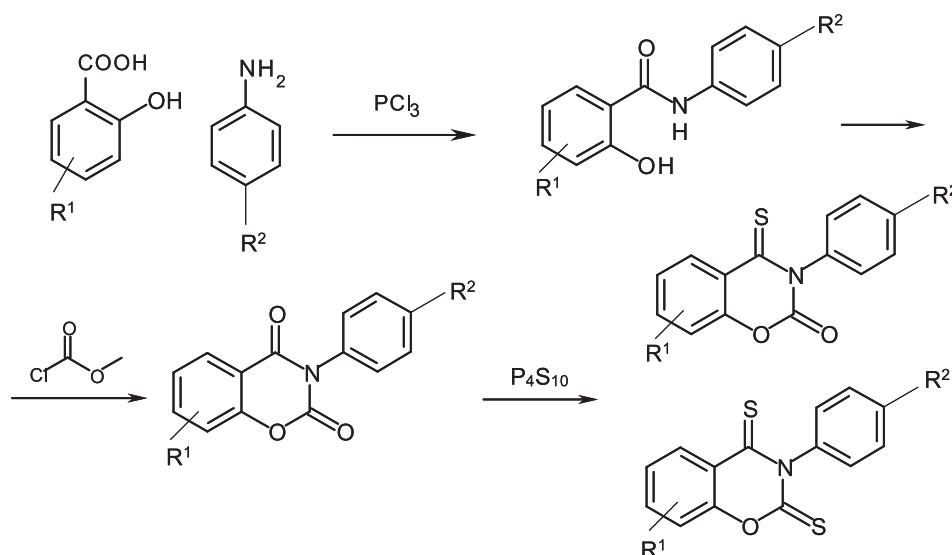
3-Fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony patří k neaktivnějším sloučeninám, které byly na našem pracovišti vytvořeny. Holý, 2001 (128) se v rámci své disertační práce věnoval přípravě 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů substituovaných v poloze šest (128). U připravených sloučenin byla provedena QSAR analýza podle Freeho-Wilsona v modifikaci podle Fujity a Bana pro jednotlivá obměňovaná místa. Provedené výpočty prokázaly významný vliv substituce v poloze šest benzoxazinového skeletu a také vliv substituce na fenylu na antimykobakteriální aktivitu. Substituce methylovou skupinou v poloze čtyři na fenylu se z hlediska antimykobakteriální aktivity ukázala obecně jako efektivnější než substituce halogeny. Na základě tohoto poznatku byl navržen nový směr dalšího výzkumu a naše pozornost se obrátila k 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onům a 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionům.

Na výzkumu takto substituovaných 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů se nejprve podílely diplomantky Divišová (127) a Husáková (126), které připravily některé deriváty v rámci své diplomové a později i rigorózní práce. Mým úkolem bylo navázat na jejich předchozí výzkum. Protože se jedná o velký počet syntéz, na jejich realizaci se pod mým vedením podílela také diplomantka Petra Vrabcová.

Syntéza (Obr. 93)

3,5 mmol vysušeného výchozího benzoxazindionu bylo smíseno a rozetřeno se 7,6 mmol sulfidu fosforečného. Směs byla pod vzdušným chladičem na kovové lázni zahřívána do zčervenání při teplotě 175–200 °C. Teplota byla udržována po dobu 20 min. Do ochlazené reakční směsi byl přidán 10% roztok uhličitanu sodného. Vzniklá suspenze byla odfiltrována

a vysušena. Byla tak získána směs monosirného a disirného derivátu, která byla rozdělena na chromatografické koloně. Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a acetonu (3:1). Oba produkty byly po sloupcové chromatografii rekrystalizovány z ethanolu.



Obrázek 93: Syntéza sirných derivátů benzoxazindionu

Antimykobakteriální aktivita

U připravených sloučenin byla zjišťována jejich aktivita proti kmenům *M. tuberculosis* (My 331/88), *M. avium* (My 330/88) a dvěma kmenům *M. kansasii* (My 235/80 a 6509/96). Výsledky testů prokázaly, že sirné deriváty benzoxazindionů vykazují stejnou nebo vyšší aktivitu než INH, který byl zvolen jako standard (Tabulka 17 a 18).

Porovnáním s výchozími 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (Tab. 16) bylo zjištěno, že k nejvyššímu nárůstu antimykobakteriální aktivity dochází po záměně jedné oxoskupiny za thioxoskupinu.

Naše původní hypotéza se potvrdila a nově připravené deriváty obsahující alkyl na fenylové části vykazují obecně vyšší biologickou aktivitu než deriváty substituované halogenem na stejné části molekuly.

Nejvyšší antimykobakteriální aktivita byla zjištěna u 3-(4-*sek*-butylfenyl)-7-methyl-4-thio-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu a tento derivát je vybrán k dalšímu testování, zejména cytotoxicity a antiproliferativní aktivity.

Tabulka 16: *In vitro* antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

		MIC (μmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96	
1a	6-Br	methyl	16/16 ^a	31/31 ^a	62/62 ^a	-*
1b	6-Br	ethyl	8/8 ^b	32/32 ^b	8/16 ^b	16/16 ^b
1c	6-Cl	ethyl	8/16 ^c	16/32 ^c	16/16 ^c	16/16 ^c
1d	7-Cl	ethyl	8/8 ^b	8/16 ^b	16/16 ^b	16/16 ^b
1e	6-Br	isopropyl	2/4	8/16	8/8	4/8
1f	6-Cl	isopropyl	4/8 ^c	32/32 ^c	8/16 ^c	8/16 ^c
1g	7-Cl	isopropyl	4/4 ^d	8/16 ^d	8/16 ^d	8/8 ^d
1h	6-F	isopropyl	8/8	8/16	8/8	8/16
1i	7-CH ₃	isopropyl	250n/250n	32n/62,5n	62,5n/62,5n	32/62,5n
1j	6-Br	<i>sek</i> -butyl	4/8 ^d	16/32 ^d	8/8 ^d	8/16 ^d
1k	6-Cl	<i>sek</i> -butyl	4/8 ^c	32/32 ^c	16/16 ^c	16/16 ^c
1l	7-Cl	<i>sek</i> -butyl	4/4 ^d	8/8 ^d	8/8 ^d	8/8 ^d
1m	6-F	<i>sek</i> -butyl	8/8	8/8	8/8	4/8
1n	7-CH ₃	<i>sek</i> -butyl	250n/250n	125n/125n	125n/250n	32/62,5n
1o	6-Cl	butyl	16/16 ^c	16/16 ^c	8/8 ^c	8/16 ^c
1p	6-Cl	<i>terc</i> -butyl	8/16 ^c	16/32 ^c	8/16 ^c	8/8 ^c
1q	7-Cl	<i>terc</i> -butyl	4/4 ^c	4/8 ^c	8/16 ^c	8/8 ^c
1r	6-F	<i>terc</i> -butyl	16/16	16/16	16/16	8/16
1s	7-CH ₃	<i>terc</i> -butyl	250n/250n	125n/125n	125n/250n	125n/250n
INH			0,5/0,5	>250/>250	>250/>250	8/8

^aWaisser, Hladůvková, 2001 (129), ^bHusáková, 2008 (126), ^cKubicová, 2004 (130), ^dDivišová, 2007 (127),

^eWaisser, Matyk, 2007 (131), *netestován, n: nárůst (nebylo možné přesně stanovit hodnotu MIC)

Tabulka 17: *In vitro* antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

		MIC (μmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96	
2a	6-Br	methyl	0,5/1 ^a	32/32 ^a	2/4 ^a	2/4 ^a
2b	6-Br	ethyl	0,5/0,5 ^b	32/32 ^b	8/16 ^b	4/8 ^b
2c	6-Cl	ethyl	0,5/0,5 ^b	16/16 ^b	8/8 ^b	4/4 ^b
2d	7-Cl	ethyl	0,5/0,5 ^b	8/8 ^b	8/8 ^b	8/8 ^b
2e	6-Br	isopropyl	0,25/0,5 ^c	4/8 ^c	32/62,5 ^c	4/8 ^c
2f	6-Cl	isopropyl	0,5/1	32/125	8/16	1/2
2g	7-Cl	isopropyl	0,5/1 ^c	8/8 ^c	8/8 ^c	4/8 ^c
2h	6-F	isopropyl	0,25/0,5	0,5/1	2/4	4/4
2i	7-CH ₃	isopropyl	0,25/0,5	0,5/1	2/4	1/2
2j	6-Br	<i>sek</i> -butyl	0,25/0,5 ^c	16/32 ^c	4/8 ^c	2/4 ^c
2k	6-Cl	<i>sek</i> -butyl	0,5/1 ^c	32/32 ^c	8/8 ^c	4/8 ^c
2l	7-Cl	<i>sek</i> -butyl	1/2	8/8	4/8	1/2
2m	6-F	<i>sek</i> -butyl	0,25/0,5	1/1	4/4	2/4
2n	7-CH ₃	<i>sek</i> -butyl	0,25/0,5	0,5/0,5	40210	0,5/1
2o	6-Cl	butyl	1/2 ^b	8/16 ^b	8/16 ^b	4/4 ^b
2p	6-Cl	<i>terc</i> -butyl	0,25/0,5	1/2	8/8	4/8
2q	7-Cl	<i>terc</i> -butyl	2/2	4/8	4/8	2/4
2r	6-F	<i>terc</i> -butyl	0,25/0,5	0,5/1	4/8	8/8
2s	7-CH ₃	<i>terc</i> -butyl	0,25/0,5	0,25/0,5	2/2	1/1
INH			0,5/0,5	>250/>250	>250/>250	8/8

^aHolý, 2001 (128), ^bHusáková, 2008 (126), ^cDivišová, 2007 (127)

Tabulka 18: *In vitro* antimykobakteriální aktivita 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

		MIC (μmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96	
3a	6-Br	methyl	0,5/1 ^a	15/30 ^a	4/4 ^a	4/4 ^a
3b	6-Br	ethyl	1/2 ^b	62,5/62,5 ^b	8/16 ^b	4/8 ^b
3c	6-Cl	ethyl	0,5/0,5 ^b	8/16 ^b	8/8 ^b	4/6 ^b
3d	7-Cl	ethyl	0,5/0,5 ^b	4/8 ^b	8/16 ^b	8/16 ^b
3e	6-Br	isopropyl	0,5/1 ^c	8/16 ^c	32/62,5 ^c	4/8 ^c
3f	6-Cl	isopropyl	0,5/1	32/125	8/16	1/2
3g	7-Cl	isopropyl	0,5/1 ^c	8/8 ^c	4/8 ^c	4/4 ^c
3h	6-F	isopropyl	0,25/0,5	0,5/1	4/8	2/4
3i	7-CH ₃	isopropyl	0,5/1	0,5/0,5	2/4	1/2
3j	6-Br	<i>sek</i> -butyl	1/2 ^c	32/32 ^c	4/8 ^c	2/4 ^c
3k	6-Cl	<i>sek</i> -butyl	1/2 ^c	16/32 ^c	8/16 ^c	4/8 ^c
3l	7-Cl	<i>sek</i> -butyl	1/1	4/8	4/8	1/2
3m	6-F	<i>sek</i> -butyl	0,25/0,25	0,5/1	2/4	2/4
3n	7-CH ₃	<i>sek</i> -butyl	0,25/0,5	0,25/0,5	2/2	0,5/1
3o	6-Cl	butyl	2/4 ^b	8/16 ^b	8/8 ^b	8/8 ^b
3p	6-Cl	<i>terc</i> -butyl	0,25/0,5	1/2	8/8	8/8
3q	7-Cl	<i>terc</i> -butyl	0,5/0,5	2/4	2/4	2/4
3r	6-F	<i>terc</i> -butyl	0,5/0,5	0,5/1	8/8	4/8
3s	7-CH ₃	<i>terc</i> -butyl	0,25/0,5	0,5/1	2/2	1/2
INH			0,5/0,5	>250/>250	>250/>250	8/8

^aHolý, 2001 (128), ^bHusáková, 2008 (126), ^cDivišová, 2007 (127)

Studium vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou

Ke studiu vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou byla opět použita metoda podle Freeho a Wilsona s modifikací podle Fujity-Bana. Abychom vyšetřili vliv alkylů na antimykobakteriální aktivitu, zařadili jsme do výpočtu i hodnoty MIC sirných derivátů 6-brom-3-(4-propylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu, 6-brom-3-(4-butylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu a 3-(4-butylfenyl)-7-chlor-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu (132). Na základě provedených výpočtů bylo zjištěno, že k nárůstu biologické aktivity nejvíce přispívá substituce fluorem nebo methylovou skupinou na acylové části a substituce rozvětveným alkylem na fenylu (Tabulka 19 a 20).

Tabulka 19: Freeho-Wilsonova analýza v modifikaci dle Fujity a Bana pro 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony

		$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/l}$) 14 d			
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
		My 331/88	My 330/88	My 235/80	6509/96
R ¹	7-Cl	0	0	0	0
	6-Cl	-0,482 (\pm 0,197)	0,180 (\pm 0,208)	0,060 (\pm 0,144)	-0,060 (\pm 0,161)
	6-Br	-0,295 (\pm 0,212)	0,176 (\pm 0,224)	0,202 (\pm 0,155)	0,133 (\pm 0,173)
	6-F	-0,563 (\pm 0,237)	-0,949 (\pm 0,251)	-0,292 (\pm 0,173)	0,218 (\pm 0,194)
	7-CH ₃	-0,563 (\pm 0,237)	-1,150 (\pm 0,251)	-0,594 (\pm 0,173)	-0,485 (\pm 0,194)
	R ²	methyl	-0,301 (\pm 0,440)	-0,028 (\pm 0,466)	-0,602 (\pm 0,322)
ethyl		-0,337 (\pm 0,380)	-0,244 (\pm 0,403)	0,115 (\pm 0,278)	-0,092 (\pm 0,311)
isopropyl		-0,396 (\pm 0,371)	-0,499 (\pm 0,393)	0,206 (\pm 0,272)	-0,370 (\pm 0,304)
sek-butyl		-0,335 (\pm 0,371)	-0,318 (\pm 0,393)	-0,034 (\pm 0,272)	-0,551 (\pm 0,304)
terc-butyl		-0,269 (\pm 0,394)	-0,925 (\pm 0,417)	0,108 (\pm 0,288)	-0,237 (\pm 0,322)
propyl		0	0	0	0
butyl		0,767 (\pm 0,380)	-0,444 (\pm 0,403)	0,315 (\pm 0,278)	0,109 (\pm 0,311)
μ_0		0,295 (\pm 0,376)	1,329 (\pm 0,398)	0,701 (\pm 0,275)	0,770 (\pm 0,308)
r		0,9	0,94	0,89	0,88
s		0,311	0,329	0,227	0,254
F	4,94	8,92	4,06	3,58	
n	22	22	22	22	

Tabulka 20: Freeho-Wilsonova analýza v modifikaci dle Fujity a Bana pro 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony

		$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/l}$) 14 d			
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
		My 331/88	My 330/88	My 235/80	6509/96
R ¹	7-Cl	0	0	0	0
	6-Cl	-0,180 (\pm 0,168)	0,301 (\pm 0,200)	0,241 (\pm 0,135)	0,120 (\pm 0,150)
	6-Br	-0,234 (\pm 0,181)	0,830 (\pm 0,216)	0,299 (\pm 0,146)	0,200 (\pm 0,162)
	6-F	-0,280 (\pm 0,202)	-0,888 (\pm 0,241)	0,047 (\pm 0,163)	0,096 (\pm 0,181)
	7-CH ₃	-0,280 (\pm 0,202)	-0,988 (\pm 0,241)	-0,254 (\pm 0,163)	-0,406 (\pm 0,181)
	R ²	methyl	-0,301 (\pm 0,375)	-0,329 (\pm 0,447)	-0,301 (\pm 0,303)
ethyl		-0,016 (\pm 0,324)	0,048 (\pm 0,387)	0,119 (\pm 0,262)	-0,108 (\pm 0,291)
isopropyl		-0,026 (\pm 0,317)	0,136 (\pm 0,378)	-0,009 (\pm 0,256)	-0,464 (\pm 0,284)
sek-butyl		0,095 (\pm 0,317)	-0,045 (\pm 0,378)	-0,129 (\pm 0,256)	-0,525 (\pm 0,284)
terc-butyl		-0,323 (\pm 0,336)	-0,357 (\pm 0,401)	-0,011 (\pm 0,271)	-0,204 (\pm 0,302)
propyl		0	0	0	0
butyl		1,120 (\pm 0,324)	-0,149 (\pm 0,387)	0,320 (\pm 0,262)	0,194 (\pm 0,291)
μ_0		-0,234 (\pm 0,321)	0,676 (\pm 0,383)	0,604 (\pm 0,259)	0,703 (\pm 0,288)
r		0,93	0,95	0,86	0,9
s		0,265	0,316	0,214	0,238
F	6,57	10,85	3,12	4,56	
n	22	22	22	22	

Antibakteriální a antifungální aktivita

In vitro aktivita 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů byla stanovována proti osmi bakteriálním kmenům. Jednalo se jak o sbírkové kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961, tak i kmeny klinicky izolované: *S. aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní, *S. epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 a *K. pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní (Tabulka 21–24).

Sloučeniny 3-(4-*sek*-butylfenyl)-6-fluor-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on a 3-(4-*sek*-butylfenyl)-6-fluor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion byly testovány i proti houbovým organismům *Candida albicans* ACC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445. Podmínky testování byly stejné jako v případě testování antibakteriální a antifungální aktivity fenylsalicylátů (kapitola 4.2.).

Všechny testované sloučeniny s výjimkou 3-(4-*isopropyl*fenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu, 3-(4-*terc*-butylfenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu a 3-(4-*sek*-butylfenyl)-7-methyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu vykazovaly vysokou aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Tato antibakteriální aktivita byla srovnatelná nebo vyšší než aktivita léčiv, která byla do studie zařazena pro porovnání. Jednalo se o léčiva neomycin, penicilin G, ciprofloxacín a fenoxymethylpenicilin. Žádná z testovaných sloučenin však nebyla aktivní proti gramnegativním bakteriím.

3-(4-*Sek*-butylfenyl)-6-fluor-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-on a 3-(4-*sek*-butylfenyl)-6-fluor-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion nevykazovaly žádnou aktivitu proti houbovým organismům, proto bylo od testování dalších derivátů odstoupeno.

Tabulka 21: Antibakteriální aktivita sloučenin 2b-2i

	MIC ($\mu\text{mol/l}$) 24 h/48 h											
	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h	2i	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	7,81/ 31,25	1,95/ 3,9	1,95/ 3,9	0,98/ 1,95	3,9/ 3,9	1,95/ 1,95	n/n	>125/ >125	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rezistentní	15,62/ 31,25	1,95/ 3,9	1,95/ 3,9	0,98/ 0,98	1,95/ 3,9	1,95/ 1,95	n/h	>125/ >125	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	7,81/ 31,25	31,25/ 31,25	125/ >125	1,95/ 1,95	1,95/ 3,9	1,95/ 3,9	n/n	>125/ >125	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	125/ >125	125/ >125	125/ >125	15,62/ >125	3,9/ 3,9	15,62/ >125	n/h	>125/ >125	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	n/n	>125/ >125	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	n/h	>125/ >125	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	n/n	>125/ >125	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	n/h	>125/ >125	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

n: MIC se nepodařilo stanovit kvůli nízké rozpustnosti sloučeniny v testovacím médiu. Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacín, Phen: fenoxymethylpenicilin

Tabulka 22: Antibakteriální aktivita sloučenin 2k-2s

	MIC (μmol/l) 24 h/48 h											
	2k	2l	2m	2n	2o	2p	2r	2s	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	1,95/ 1,95	1,95/ 1,95	1,95/ 1,95	>125/ >125	7,81/ ,81	1,98/ 1,98	3,9/ 7,81	125/ 125	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rezistentní	0,98/ 1,95	1,95/ 1,95	1,95/ 3,9	>125/ >125	0,49/ 0,98	0,49/ 0,98	3,9/ 3,9	125/ 125	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	1,95/ 1,95	1,95/ 3,9	7,81/ 15,62	>125/ >125	0,98/ 0,98	1,98/ 1,98	3,9/ 3,9	1,95/ 31,25	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	3,9/ 15,62	3,9/ 31,25	3,9/ 15,62	>125/ >125	15,62/ >250	7,81/ 62,5	15,62/ 125	>125/ >125	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>250/ >250	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>250/ >250	>250/ >250	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>250/ >250	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>250/ >250	>250/ >250	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>250/ >250	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>250/ >250	>250/ >250	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>250/ >250	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>250/ >250	>250/ >250	>125/ >125	>125/ >125	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacin, Phen: fenoxymethylpenicilin

Tabulka 23: Antibakteriální aktivita sloučenin 3b-3j

	MIC (μmol/l) 24 h/48 h												
	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	3i	3j	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	3,9/ 3,9	7,81/ 7,81	3,9/ 3,9	1,95/ 1,95	0,98/ 1,95	1,95/ 1,95	1,95/ 3,9	1,95/ 62,5	0,98/ 0,98	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rezistentní	1,95/ 3,9	3,9/ 7,81	7,81/ 15,62	1,95/ 7,81	0,98/ 3,9	3,9/ 15,62	15,62/ 31,25	7,81/ 62,5	1,95/ 1,95	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	1,95/ 3,9	15,62/ 15,62	31,25/ >500	3,9/ 7,81	1,95/ 15,62	3,9/ 31,25	15,62/ 62,5	15,62/ >125	1,95/ 1,95	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus</i> sp. J 14365/08	7,81/ 125	31,25/ 125	125/ >500	31,25/ >125	15,62/ >125	62,5/ >500	62,5/ >125	>125/ >125	15,62/ >125	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>500/ >500	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacin, Phen: fenoxymethylpenicilin

Tabulka 24: Antibakteriální aktivita sloučenin 3k-3s

	MIC (μmol/l) 24 h/48 h											
	3k	3l	3m	3n	3o	3p	3r	3s	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	1,95/ 1,95	0,98/ 1,95	0,98/ 0,98	>250/ >250	3,9/ 3,9	n/n	n/n	n/n	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rezistentní	1,95/ 1,95	0,98/ 1,95	1,95/ 1,95	>250/ >250	3,9/ 3,9	n/n	n/n	n/n	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	1,95/ 3,9	1,95/ 7,81	1,95/ 3,9	>250/ >250	1,95/ 3,9	n/n	n/n	n/n	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	31,25/ >125	7,81/ 125	7,81/ 7,81	>250/ >250	31,25/ >500	n/n	n/n	n/n	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>250/ >250	>500/ >500	n/n	n/n	n/n	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>250/ >250	>500/ >500	n/n	n/n	n/n	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>250/ >250	>500/ >500	n/n	n/n	n/n	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>125/ >125	>250/ >250	>500/ >500	>250/ >250	>500/ >500	n/n	n/n	n/n	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

n: MIC se nepodařilo stanovit kvůli nízké rozpustnosti sloučeniny v testovacím médiu, Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacin, Phen: fenoxymethylpenicilin

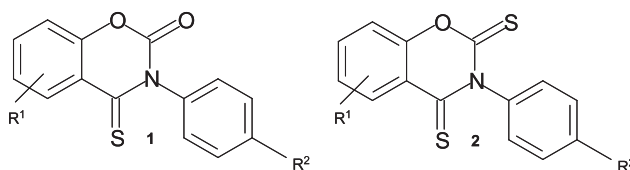
Podíl na publikaci

1. Připravila jsem následující sloučeniny:
 - a) 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony: **1e**, **1h**, **1m**, **1r**.
 - b) 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony: **2f**, **2h**, **2l**, **2m**, **2p**, **2q**, **2r**.
 - c) 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony: **3f**, **3h**, **3l**, **3m**, **3p**, **3q**, **3r**.
2. **Sloučeniny 1i, 1n, 1s, 2i, 2n, 2s, 3i, 3n a 3s** připravila pod mým vedením diplomantka Petra Vrabcová, ostatní deriváty připravili RNDr. Hana Divišová, RNDr. Petra Husáková a sloučeniny **1a, 2a a 3a** Ing. Pavel Holý, PhD.
3. U celého souboru sloučenin jsem provedla výpočty týkající se vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou.
4. Získané výsledky jsem zpracovala v podobě publikace.

4.6. Studium lipofility u 3-fenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů a 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů.

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K.: TLC Study of the Lipophilicity of New Antibacterial Active Benzoxazine Derivatives Containing a Thioxo Group. *J. Planar. Chromatography*, under review.

U 3-fenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů a 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů byla studována lipofilita pomocí tenkovrstvé chromatografie na obrácených (reverzních) fázích. U tohoto typu chromatografie je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Jako mobilní fáze se používá zpravidla silikagel se zakotvenou nepolární látkou, kterou bývá dlouhý uhlovodíkový zbytek s osmi nebo osmnácti atomy uhlíku a molekuly sloučenin jsou na tento uhlovodíkový zbytek poutány van der Waalsovými silami. Polární mobilní fázi může být například směs voda-methanol, voda-acetonitril nebo voda-aceton. Přehled sloučenin zařazených do studie lipofility ukazuje tabulka 25.



Tabulka 25: Přehled sloučenin zařazených do studie lipofility

	R ¹	R ²		R ¹	R ²
a	6-F	isopropyl	h	6-Br	sek-butyl
b	6-Cl	isopropyl	i	7-Cl	sek-butyl
c	6-Br	isopropyl	j	7-CH ₃	sek-butyl
d	7-Cl	isopropyl	k	6-F	terc-butyl
e	7-CH ₃	isopropyl	l	6-Cl	terc-butyl
f	6-F	sek-butyl	m	7-Cl	terc-butyl
g	6-Cl	sek-butyl	n	7-CH ₃	terc-butyl

Jako mobilní fáze sloužila v našem případě směs fosfátového pufru (pH 7,4) s různým podílem acetonu. Koncentrace acetonu se pohybovala v rozmezí 60–80 %. Ze zjištěných hodnot retenčních faktorů R_F (průměr ze tří měření) byly vypočítány hodnoty R_M dle rovnice:

$$R_M = \log (1/R_F - 1)$$

Hodnoty R_M jsou uvedeny v tabulkách 26 a 27. Mezi hodnotami R_M a složením mobilní fáze byl nalezen lineární vztah (Obr. 94 a 95), což umožnilo extrapolaci na nulovou hodnotu acetonu. (Tabulka 28 a 29).

Tabulka 26: Hodnoty R_M 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů

	R_M					
	aceton (%)					
	80	75	70	65	60	0
1a	-0,09	0,11	0,39	0,55	0,79	3,423
1b	-0,07	0,19	0,43	0,63	0,87	3,638
1c	-0,04	0,21	0,48	0,69	0,95	3,895
1d	-0,07	0,19	0,43	0,63	0,87	3,638
1e	-0,07	0,12	0,39	0,58	0,83	3,509
1f	-0,02	0,21	0,45	0,69	0,91	3,707
1g	0,04	0,25	0,53	0,79	1,01	3,991
1h	0,04	0,27	0,55	0,83	1,01	4,032
1i	0,02	0,25	0,53	0,79	1,01	3,991
1j	-0,02	0,23	0,48	0,72	0,95	3,878
1k	-0,04	0,19	0,43	0,69	0,87	3,641
1l	0,02	0,25	0,5	0,79	1,01	4,031
1m	0,02	0,25	0,5	0,79	1,01	4,031
1n	-0,02	0,21	0,45	0,72	0,91	3,757

Tabulka 27: Hodnoty R_M 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů

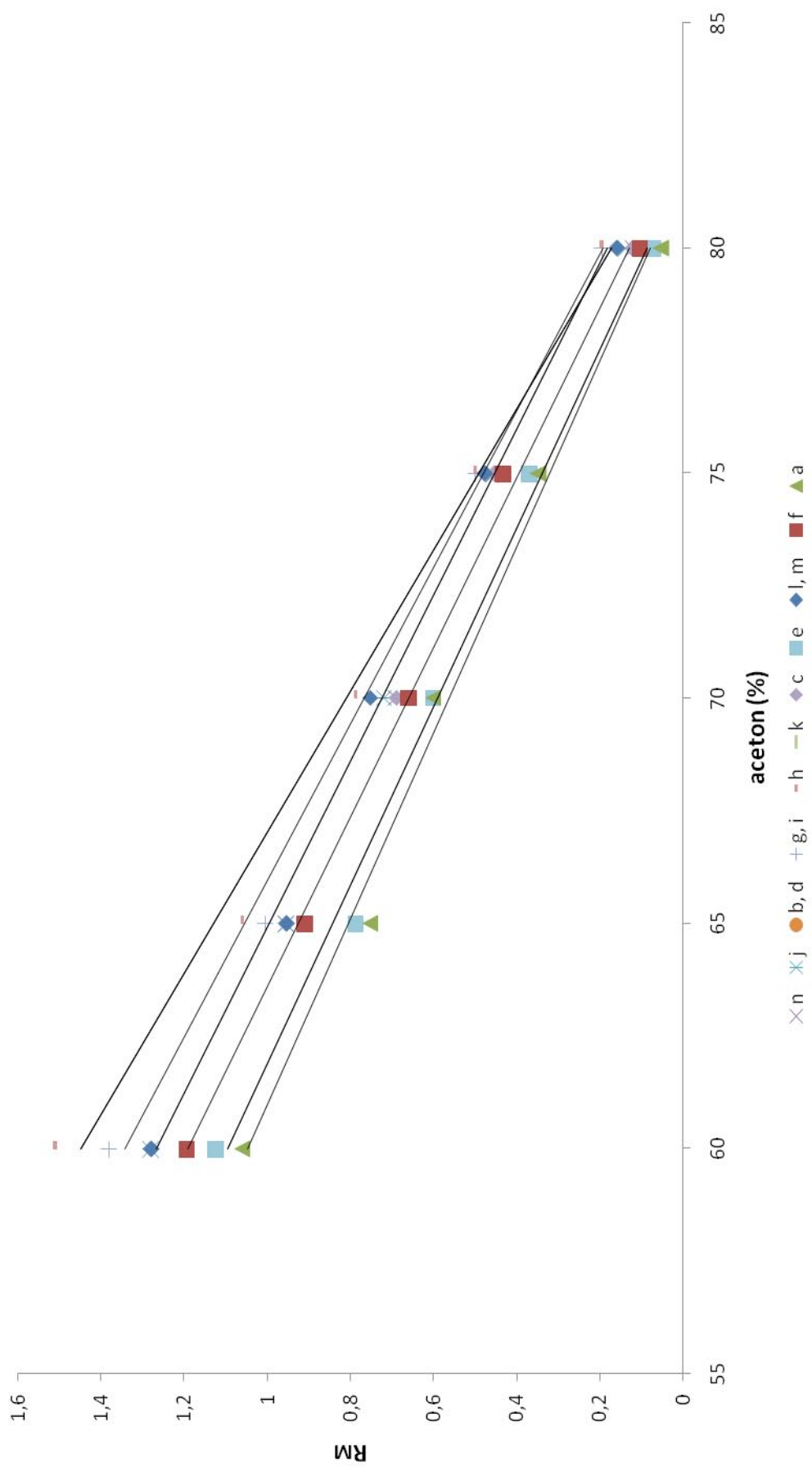
	R_M					
	aceton (%)					
	80	75	70	65	60	0
2a	0,05	0,35	0,6	0,75	1,06	3,955
2b	0,11	0,43	0,66	0,91	1,2	4,378
2c	0,12	0,45	0,69	0,95	1,28	4,637
2d	0,11	0,43	0,66	0,91	1,19	4,378
2e	0,07	0,37	0,6	0,79	1,12	4,129
2f	0,11	0,43	0,66	0,91	1,2	4,378
2g	0,19	0,5	0,75	1,01	1,38	4,793
2h	0,19	0,5	0,79	1,06	1,51	5,277
2i	0,18	0,48	0,75	1,01	1,38	4,869
2j	0,14	0,45	0,72	0,95	1,28	4,597
2k	0,11	0,43	0,66	0,91	1,12	4,378
2l	0,16	0,48	0,75	0,95	1,28	4,834
2m	0,16	0,48	0,75	0,95	1,28	4,834
2n	0,12	0,45	0,69	0,95	1,2	4,639

Tabulka 28: Rovnice dle Soczewinskiho-Wachtmeistera pro 3-fenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony

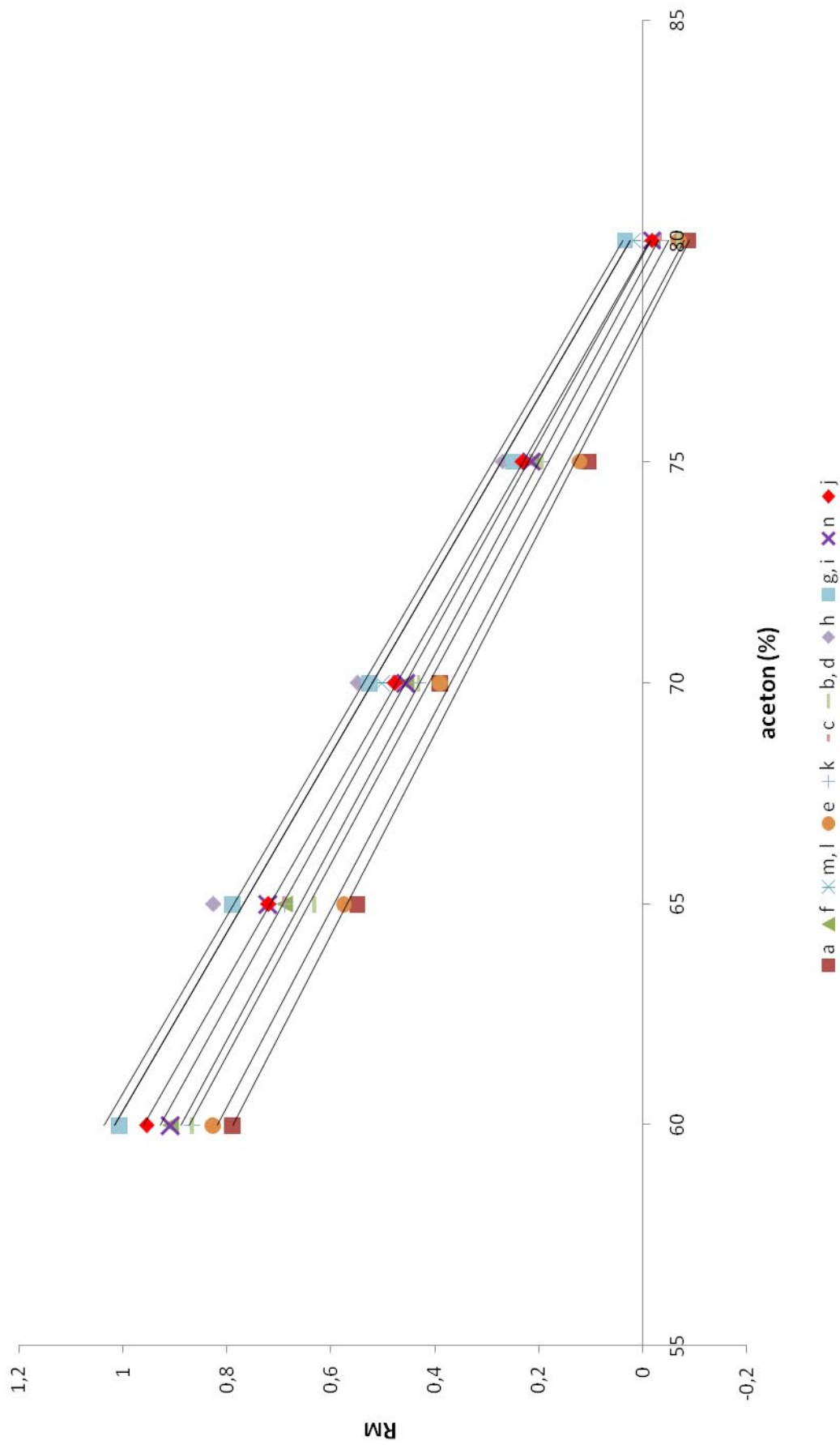
	$R_M = \mathbf{b} \cdot \mathbf{c} + R_M^0$	\mathbf{r}	\mathbf{s}	\mathbf{F}	\mathbf{n}
1a	$R_M = -0,044 c + 3,423$	-0,997	0,029	566,49	5
1b	$R_M = -0,046 c + 3,638$	-0,999	0,020	1402,68	5
1c	$R_M = -0,049 c + 3,895$	-0,999	0,014	3060,96	5
1d	$R_M = -0,046 c + 3,638$	-0,999	0,020	1328,08	5
1e	$R_M = -0,045 c + 3,509$	-0,998	0,022	1071,81	5
1f	$R_M = -0,465 c + 3,707$	-0,999	0,007	12523,79	5
1g	$R_M = -0,050 c + 3,991$	-0,998	0,02	1609,64	5
1h	$R_M = -0,050 c + 4,032$	-0,998	0,032	615,06	5
1i	$R_M = -0,050 c + 3,991$	-0,999	0,018	2064,52	5
1j	$R_M = -0,049 c + 3,878$	-0,999	0,006	19604,15	5
1k	$R_M = -0,046 c + 3,641$	-0,999	0,023	1037,16	5
1l	$R_M = -0,050 c + 4,031$	-0,999	0,019	1739,56	5
1m	$R_M = -0,050 c + 4,031$	-0,999	0,018	1861,8	5
1n	$R_M = -0,047 c + 3,757$	-0,999	0,020	1347,88	5

Tabulka 29: Rovnice dle Soczewinskiho-Wachtmeistera pro 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony

	$R_M = \mathbf{b} \cdot \mathbf{c} + R_M^0$	\mathbf{r}	\mathbf{s}	\mathbf{F}	\mathbf{n}
2a	$R_M = -0,048 c + 3,955$	-0,990	0,044	302,65	5
2b	$R_M = -0,053 c + 4,378$	-0,996	0,028	918,06	5
2c	$R_M = -0,056 c + 4,637$	-0,996	0,030	907,54	5
2d	$R_M = -0,053 c + 4,378$	-0,996	0,028	918,06	5
2e	$R_M = -0,050 c + 4,129$	-0,992	0,041	378,81	5
2f	$R_M = -0,053 c + 4,378$	-0,996	0,028	918,06	5
2g	$R_M = -0,057 c + 4,793$	-0,994	0,039	549,7	5
2h	$R_M = -0,063 c + 5,277$	-0,990	0,056	320,66	5
2i	$R_M = -0,057 c + 4,869$	-0,994	0,035	719,7	5
2j	$R_M = -0,055 c + 4,560$	-0,997	0,027	1101	5
2k	$R_M = -0,050 c + 4,378$	-0,994	0,028	918,06	5
2l	$R_M = -0,054 c + 4,834$	-0,994	0,058	252,51	5
2m	$R_M = -0,054 c + 4,834$	-0,994	0,058	252,51	5
2n	$R_M = -0,052 c + 4,639$	-0,996	0,030	907,54	5



Obrázek 94: Závislost R_M 3-fenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů na koncentraci acetonu



Obrázek 95: Závislost R_m 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionu na koncentraci acetonu

Lineární regresní analýza prokázala významnou závislost mezi experimentálními hodnotami R_M pro všechny koncentrace acetonu a hodnotami $\log P$, které byly vypočítány programem ChemBioDraw Ultra 11.0. Hodnota korelačního koeficientu se pohybovala v rozmezí 0,90–0,95 pro 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a v rozmezí 0,92–0,96 pro 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony. Závislost $\log P$ na R_M a R_M^0 byla ve všech případech prokázána na hladině významnosti 0,001. K vyjádření lipofility těchto sloučenin lze tedy použít jak hodnot R_M/R_M^0 tak i $\log P$ (Tabulka 30 a 31).

Tabulka 30: Vzájemná závislost mezi R_M a $\log P$ u 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů

aceton (%)	Rovnice	r	s	F	n
0	$\log P = 1,29 (\pm 0,14) R_M + 0,68 (\pm 0,54)$	0,93	0,110	80,93	14
60	$\log P = 3,59 (\pm 0,42) R_M + 2,24 (\pm 0,39)$	0,93	0,115	72,06	14
65	$\log P = 3,22 (\pm 0,31) R_M + 3,29 (\pm 0,22)$	0,95	0,097	104,63	14
70	$\log P = 5,36 (\pm 0,68) R_M + 3,06 (\pm 0,32)$	0,92	0,122	61,80	14
75	$\log P = 5,58 (\pm 0,70) R_M + 4,39 (\pm 0,15)$	0,92	0,121	63,04	14
80	$\log P = 6,33 (\pm 0,87) R_M + 5,70 (\pm 0,04)$	0,90	0,130	53,10	14

Tabulka 31: Vzájemná závislost mezi R_M a $\log P$ u 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

aceton (%)	Rovnice	r	s	F	n
0	$\log P = 0,83 (\pm 0,06) R_M + 2,92 (\pm 0,29)$	0,97	0,080	32,48	14
60	$\log P = 2,30 (\pm 0,18) R_M + 3,78 (\pm 0,23)$	0,96	0,080	159,11	14
65	$\log P = 3,32 (\pm 0,42) R_M + 3,63 (\pm 0,39)$	0,92	0,121	63,63	14
70	$\log P = 4,64 (\pm 0,48) R_M + 3,49 (\pm 0,33)$	0,94	0,102	94,40	14
75	$\log P = 6,09 (\pm 0,71) R_M + 4,00 (\pm 0,32)$	0,93	0,114	73,63	14
80	$\log P = 6,21 (\pm 0,75) R_M + 5,91 (\pm 0,10)$	0,92	0,117	68,93	14

Kromě programu ChemBioDraw Ultra 11.0 byly k výpočtu $\log P$ použity i jiné softwarové produkty. Jednalo se o ALOGPs, ACD $\log P$, AB/LogP, MiLogP, ALOGP, MLOGP, KowWIN, XLOGP₂, XLOGP₃, které lze nalézt v podobě freewaru na internetu (Tabulka 32 a 33) (116, 117). Nejvyšší korelace byla zjištěna mezi R_M^0 a hodnotami AB/ $\log P$ (korelační koeficient $r = 0,96$ pro 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony (Tabulka 34) a $r = 0,97$ pro 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony) (Tabulka 35).

Tabulka 32: Log P vypočítané pomocí různého softwaru

	Log P 3-(4-alkylfeny)l-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů										
	ALOGPs	ACD logP	AB/Log P	miLogP	ALOGP	MLOGP	KowWIN	XLOGP ₂	XLOGP ₃	ChemBioDraw	
1a	4,39	5,12	4,00	3,10	5,29	4,27	4,66	4,54	4,59	4,94	
1b	4,83	5,68	4,52	4,58	5,75	4,39	5,11	5,00	5,11	5,34	
1c	5,10	5,76	4,61	4,71	5,84	4,51	5,35	5,19	5,18	5,61	
1d	4,82	5,68	4,52	4,58	5,75	4,39	5,11	5,00	5,11	5,34	
1e	4,45	5,38	4,14	4,35	5,57	4,12	5,01	4,81	4,85	5,27	
1f	4,93	5,59	4,48	3,44	5,75	4,51	5,16	5,11	5,13	5,36	
1g	5,31	6,14	5,00	4,93	6,21	4,62	5,60	5,57	5,66	5,76	
1h	5,62	6,23	5,09	5,06	6,29	4,74	5,85	5,74	5,72	6,03	
1i	5,29	6,14	5,00	4,93	6,21	4,62	5,60	5,57	5,66	5,76	
1j	5,00	5,84	4,63	4,70	6,03	4,36	5,50	5,38	5,39	5,69	
1k	4,90	5,55	4,47	3,29	5,50	4,51	5,12	4,95	5,13	5,41	
1l	5,29	6,10	4,99	4,78	5,96	4,62	5,56	5,41	5,66	5,81	
1m	5,28	6,10	4,99	4,78	5,96	4,62	5,56	5,41	5,66	5,81	
1n	4,93	5,80	4,61	4,55	5,78	4,36	5,46	5,22	5,40	5,74	

Tabulka 33: Log P vypočítané pomocí různého softwaru

	Log P 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů									
	ALOGPs	ACD logP	AB/Log P	miLogP	ALOGP	MLOGP	KowWIN	XLOGP ₂	XLOGP ₃	ChemBioDraw
2a	4,37	5,80	4,16	3,44	6,19	4,70	5,30	4,79	5,19	6,09
2b	4,77	6,35	4,74	4,93	6,65	4,82	5,74	5,25	5,71	6,49
2c	5,01	6,43	4,93	5,06	6,74	4,94	5,99	5,42	5,78	6,76
2d	4,76	6,35	4,74	4,93	6,65	4,82	5,74	5,25	5,71	6,49
2e	4,50	6,05	4,53	4,70	6,47	4,55	5,64	5,06	5,45	6,42
2f	4,84	6,26	4,65	3,78	6,65	4,94	5,79	5,36	5,73	6,51
2g	5,26	6,81	5,23	5,27	7,11	5,05	6,23	5,82	6,26	6,91
2h	5,45	6,90	5,42	5,40	7,19	5,17	6,48	5,99	6,32	7,18
2i	5,25	6,81	5,23	5,27	7,11	5,05	6,23	5,82	6,26	6,91
2j	5,00	6,51	5,01	5,04	6,93	4,78	6,13	5,63	5,99	6,84
2k	4,87	6,22	4,64	3,63	6,40	4,94	5,75	5,20	5,73	6,56
2l	5,28	6,77	5,22	5,12	6,86	5,05	6,19	5,66	6,26	6,96
2m	5,27	6,77	5,22	5,12	6,86	5,05	6,19	5,66	6,26	6,96
2n	4,99	6,47	5,00	4,89	6,68	4,78	6,10	5,48	6,00	6,89

Tabulka 34: Collanderovy rovnice vyjadřující vztah mezi R_M hodnotami a hodnotami $\log P$ vypočítanými různým softwarem

3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony					
	Rovnice	r	s	F	n
ALOGPs	$\log P = 1,515 R_M^0 - 0,749$	0,95	0,112	106,09	14
ACDlogP	$\log P = 1,473 R_M^0 + 0,193$	0,96	0,094	143,14	14
AB/logP	$\log P = 1,515 R_M^0 - 1,115$	0,96	0,096	146,35	14
miLogP	$\log P = 2,258 R_M^0 - 4,170$	0,74	0,450	14,72	14
ALOGP	$\log P = 1,222 R_M^0 + 1,201$	0,91	0,125	56,29	14
MLogP	$\log P = 0,665 R_M^0 + 1,946$	0,84	0,095	28,48	14
KowWIN	$\log P = 1,402 R_M^0 + 0,001$	0,94	0,109	97,36	14
XLOGP ₂	$\log P = 1,487 R_M^0 - 0,447$	0,95	0,105	117,06	14
XLOGP ₃	$\log P = 1,561 R_M^0 - 0,633$	0,95	0,108	122,23	14
Chem BioDraw Ultra 11.0	$\log P = 1,283 R_M^0 + 0,682$	0,93	0,109	80,42	14

Tabulka 35: Collanderovy rovnice vyjadřující vztah mezi R_M hodnotami a hodnotami $\log P$ vypočítanými různým softwarem

3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony					
	Rovnice	r	s	F	n
ALOGPs	$\log P = 0,896 R_M^0 + 0,865$	0,98	0,071	239,83	14
ACDlogP	$\log P = 0,908 R_M^0 + 2,304$	0,96	0,098	129,5	14
AB/logP	$\log P = 0,992 R_M^0 + 0,363$	0,97	0,089	187,65	14
miLogP	$\log P = 1,406 R_M^0 - 1,685$	0,74	0,450	14,72	14
ALOGP	$\log P = 0,760 R_M^0 + 3,265$	0,91	0,125	56,27	14
MLogP	$\log P = 0,419 R_M^0 + 2,982$	0,84	0,094	29,87	14
KowWIN	$\log P = 0,894 R_M^0 + 1,866$	0,97	0,077	203,25	14
XLOGP ₂	$\log P = 0,934 R_M^0 + 1,178$	0,96	0,096	143,88	14
XLOGP ₃	$\log P = 0,960 R_M^0 + 1,504$	0,94	0,120	96,97	14
Chem BioDraw Ultra 11.0	$\log P = 0,827 R_M^0 + 2,921$	0,97	0,078	172,23	14

Aby bylo možné zjistit příspěvek lipofility u jednotlivých substituentů (ΔR_M^0), byly hodnoty AB/logP použity k výpočtu R_M^0 pro deriváty jednak s nesubstituovanou acylovou částí, jednak s nesubstituovanou částí fenylovou. R_M^0 nesubstituovaných 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-onů byly vypočítány podle rovnice:

$$R_M^0 = 0,609 \log P + 0,968; r = 0,96, s = 0,061, F = 146,35, n = 14$$

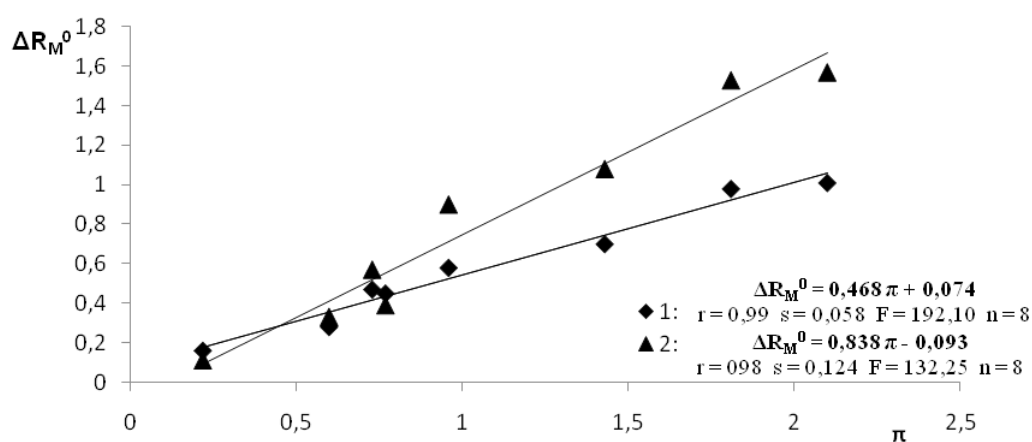
Hodnoty nesubstituovaných 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů pak dle rovnice:

$$R_M^0 = 0,946 \log P + 0,068; r = 0,97, s = 0,087, F = 187,65, n = 14$$

Vypočítané ΔR_M^0 pro jednotlivé substituenty (Tabulka 36) byly následně srovnávány se substituentovými parametry π a byla mezi nimi zjištěna vzájemná závislost (Obr. 96).

Tabulka 36: Hodnoty $AB/\log P$, R_M^0 nesubstituovaných derivátů, ΔR_M^0 a hodnoty π

R^1	R^2	3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony			3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony			π
		$AB/\log P$	R_M^0	ΔR_M^0	$AB/\log P$	R_M^0	ΔR_M^0	
H	isopropyl	2,73	3,24	0,70	4,12	2,78	1,08	1,43
H	sek-butyl	4,22	3,54	1,01	4,60	3,33	1,57	2,10
H	terc-butyl	4,20	3,53	0,98	4,59	3,51	1,53	1,81
6-F	H	2,85	2,70	0,16	3,01	3,13	0,11	0,22
6-Cl	H	3,37	3,02	0,45	3,59	3,33	0,39	0,77
6-Br	H	3,46	3,08	0,58	3,75	3,83	0,90	0,96
7-CH ₃	H	2,99	2,79	0,28	3,38	4,28	0,33	0,60
7-Cl	H	3,37	3,02	0,47	3,59	4,27	0,57	0,73



Obrázek 96: Vzájemný vztah mezi ΔR_M^0 a konstantami π 1: 3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-ony, 2: 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithiony

Podíl na publikaci

Tato práce patřila k mým samostatným úkolům. Na výzkumu lipofility sírných derivátů 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu se společně se mnou nepodílel žádný jiný student.

4.7. Syntéza a antimykobakteriální aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů

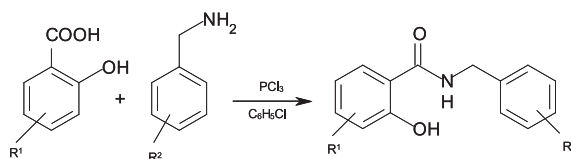
DOLEŽAL, R., WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., KUBICOVÁ, L., MACHÁČEK, M., KAUSTOVÁ, J., DAHSE, H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics, *Arch. Pharm. Life Sci.* 2009, vol. 342, no. 2, p. 113–119.

Skupina *N*-benzylthiosalicylamidů byla navržena na základě poznatku, že zavedení síry do molekuly sloučeniny vede ke zvýšení antimykobakteriální aktivity např. u salicylanilidů nebo arylderivátů 1,3-benzoxazin-2,4-dionů.

Syntéza

Syntéza *N*-benzylsalicylamidů

Jedná se o jednostupňovou reakci (Obr. 97), kdy bylo 0,01 mol příslušné substituované salicylové kyseliny rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu. Při laboratorní teplotě bylo do roztoku přikapáno 0,005 mol PCl_3 a pak přidáno 0,01 mol příslušného substituovaného benzylaminu. Směs byla za intenzivního míchání zahřívána k varu 3 hodiny pod zpětným chladičem. Získaný derivát *N*-benzylsalicylamidu byl po odpaření chlorbenzenu přečištěn rekrystalizací z 30 ml vodného ethanolu (ethanol:voda = 2:1). Čistota látek byla kontrolována TLC (elučním činidlem toluen).

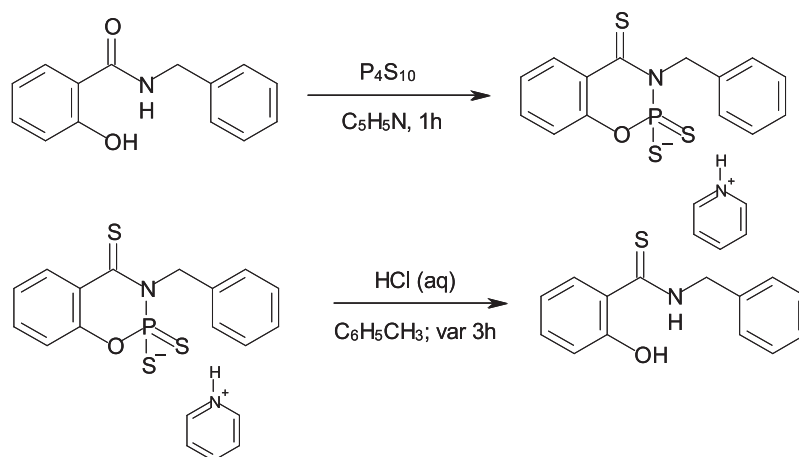


Obrázek 97: Syntéza *N*-benzylsalicylamidů

Syntéza *N*-benzylthiosalicylamidů (Obr. 98)

Ke směsi *N*-benzylsalicylamidu (1,0 g) a ekvimolárního množství sulfidu fosforečného bylo přidáno 10 ml vysušeného pyridinu. Reakční směs byla zahřívána čtyřikrát 5 minut pod zpětným chladičem v mikrovlnném reaktoru (MicroSYNTH ETHOS 1600 URM (2450 Hz)). Reakcí v mikrovlnném reaktoru vznikl pyridinium-3-aryl-2,4-dithioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3,2λ⁵-benzoxazafosfinin-2-thiolát, který byl po ochlazení převeden do směsi 150 ml toluenu a 150 ml HCl ($c \approx 0,1 \text{ mol/l}$). Směs byla zahřívána 3 hodiny pod zpětným chladičem. Ve

druhém stupni tak dochází k hydrolyze pyridinium-3-aryl-2,4-dithio-3,4-dihydro-2*H*-1,3,2λ⁵-benzoxazafosfinin-2-thiolátu. Po ochlazení byla toluenová vrstva oddělena, zahuštěna na objem přibližně 5 ml a převedena na sloupec silikagelu. Frakce obsahující thioamid byly spojeny, rozpouštědlo odpařeno a výsledný thioamid byl získán krystalizací ze směsi etanolu a vody v poměru 2:1.



Obrázek 98: Syntéza *N*-benzylthiosalicylamidů

Antimykobakteriální hodnocení připravených látek bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. K hodnocení *in vitro* byly použity kmeny z České národní sbírky kmenových kultur (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88, *M. kansasii*, My 235/80 a kmen *M. kansasii* 6509/96 klinicky izolovaný. Jako standard byl použit isoniazid (INH).

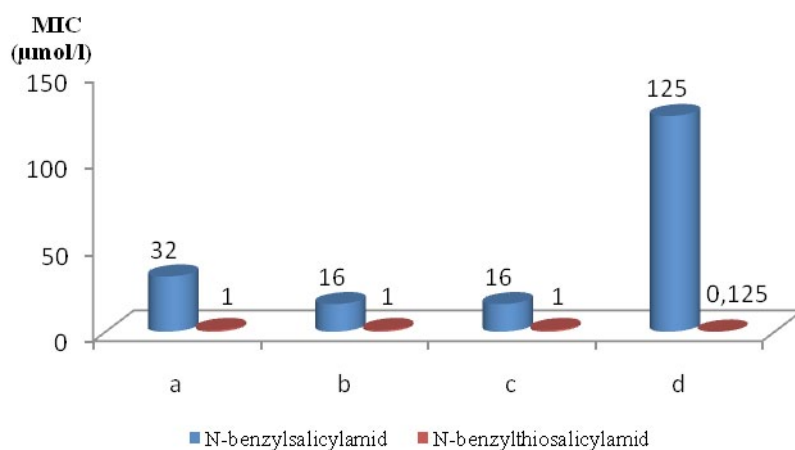
N-Benzylthiosalicylamidy vykazují podobnou aktivitu vůči kmenu *M. tuberculosis* jako INH. Minimální inhibiční koncentrace proti tomuto kmenu se pohybují v rozmezí $0,5\text{--}2 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů vůči ostatním mykobakteriálním kmenům je vyšší než v případě INH (Tabulka 37). Deriváty *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamid a 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamid jsou nejúčinnějšími deriváty, naopak jako nejméně aktivní se ukázal *N*-(4-methylbenzyl)-5-nitro-thiosalicylamid. Obrázek 99 ukazuje nárůst antimykobakteriální aktivity po zavedení síry do molekuly 5-brom-*N*-(3-brombenzyl)thiosalicylamidu (a), 5-brom-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamidu (b), *N*-(4-brombenzyl)-4-chlorthiosalicylamidu (c) a 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu (d).

U některých derivátů (Tabulka 38) byla vyhodnocována i antiproliferativní aktivita a cytotoxicita. Ke stanovení antiproliferativní aktivity byly použity buňky lidské chronické myeloidní leukémie (K562) a buňky endotelové vény lidského pupečníku (HUVEC).

Tabulka 37: Antimykobakteriální aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů

R ¹	R ²	MIC (μmol/l)			
		inkubační doba 14 d/21 d			
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
H	H	0,5/1	1/2	1/2	2/2
H	3-CH ₃	0,5/1	0,5/1	2/4	2/2
H	3-Cl	1/1	1/1	1/1	1/1
H	3-CF ₃	0,5/1	0,5/1	2/2	2/2
H	3,4-Cl ₂	0,49/0,98	0,98/0,98	2/2	2/4
H	4-CH ₃	0,25/0,5	0,25/0,5	0,5/1	0,5/1
H	4-F	0,5/1	1/2	4/4	2/2
H	4-Cl	1/2	0,5/0,5	1/1	0,5/1
H	4-OCH ₃	4/4	0,98/0,98	4/4	4/4
H	4- <i>terc</i> -butyl	1/2	0,25/0,25	2/4	2/2
3,5-Cl ₂	3,4-Cl ₂	16/32	62,5/62,5	32/62,5	32/32
3,5-Cl ₂	4- <i>terc</i> -butyl	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
3,5-Br ₂	4-CF ₃	32/32	32/32	62,5/62,5	62,5/62,5
4-CH ₃	H	0,5/1	1/2	2/2	1/2
4-CH ₃	3-NO ₂	2/2	1/2	2/4	4/4
4-CH ₃	4-CH ₃	0,125/0,25	0,25/0,5	0,25/0,5	0,5/1
4-CH ₃	4-Cl	0,5/0,5	0,5/0,5	0,5/1	1/1
4-CH ₃	4- <i>terc</i> -butyl	0,5/0,5	1/2	1/1	1/1
4-Cl	4-Br	1/2	2/4	8/16	4/8
4-OCH ₃	H	2/4	4/4	8/8	8/8
4-OCH ₃	3-Cl	0,5/1	1/2	2/2	1/1
5-Cl	H	2/2	8/8	8/8	8/8
5-Cl	4-F	1/2	8/8	8/16	8/8
5-Cl	3,4-Cl ₂	2/4	16/32	32/32	16/16
5-Br	3,4-Cl ₂	4/4	16/16	16/32	16/16
5-Br	3-Br	1/2	8/8	8/8	8/8
5-Br	4-Br	1/2	4/4	8/16	4/4
5-NO ₂	4-CH ₃	32/62,5	>125/>125	125/125	125/125
5-OCH ₃	3-Cl	4/8	4/4	16/32	16/16
INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

Hodnoty GI₅₀ a IC₅₀ vypovídají o určité aktivitě, nicméně ke stanovení závěru ohledně toxicity je třeba sloučeniny otestovat na kulturách zdravých buněk.



Obrázek 99: Zvýšení antimykobakteriální aktivity po zavedení síry do molekuly 5-brom-*N*-(3-brombenzyl)thiosalicylamidu (a), 5-brom-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamidu (b), *N*-(4-brombenzyl)-4-chlorthiosalicylamidu (c) a 4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu (d); *M. tuberculosis* 14 d

Tabulka 38: Antiproliferativní aktivita a cytotoxicita

R ¹	R ²	Huvec GI ₅₀ (µg/ml)	K-562 GI ₅₀ (µg/ml)	HeLa CC ₅₀ (µg/ml)
H	H	9,2	8,7	11,1
H	4-CH ₃	10	9,9	12,5
H	4-Cl	5,9	5,2	5,5
H	4-OCH ₃	19,2	14,8	21,6
H	3,4-Cl ₂	5,9	5,2	5,6
4-CH ₃	4-CH ₃	12,5	13	12,4
H	4- <i>tert</i> -butyl	4,6	3,5	3,7
INH		>50,0	>50,0	>50,0
ETH		37,2	50	40,8

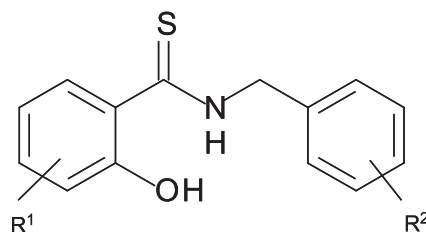
Podíl na publikaci

Připravila jsem tři sloučeniny: 5-brom-*N*-(3-brombenzyl)salicylamid, 5-brom-*N*-(4-brombenzyl)salicylamid a *N*-(4-brombenzyl)-4-chlorsalicylamid.

4.8. Antimykotická aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUCHTA, V., JÍLEK, P., VEJSOVÁ, M.: *N*-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with Promising Antimycotic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, p. 4535–4538.

Na základě předpokladu, že sloučeniny vykazující antimykobakteriální aktivitu mohou mít i antifungální účinek, jsme se rozhodli *N*-benzylthiosalicylamidy otestovat proti některým houbovým organismům. Tabulka 39 ukazuje přehled sloučenin zařazených do testování antifungální aktivity, jejich log *P* vypočítané pomocí ChemBioDraw Ultra 11.0 a p*K*_a vypočítané programem SPARC 4.0.



Tabulka 39: Přehled sloučenin zařazených do testování antifungální aktivity, jejich log *P* a p*K*_a

	R ¹	R ²	log <i>P</i>	p <i>K</i> _a		R ¹	R ²	log <i>P</i>	p <i>K</i> _a
1	H	3,4-Cl ₂	4,62	7,5	12	H	3-CH ₃	3,99	7,5
2	5-Br	4-Br	5,16	6,9	13	4-CH ₃	H	3,99	7,7
3	5-Cl	4-F	4,22	7	14	4-CH ₃	4-CH ₃	4,48	7,7
4	5-Br	3-Br	5,16	6,9	15	4-OCH ₃	H	3,38	7,3
5	5-Cl	3,4-Cl ₂	5,18	6,9	16	5-NO ₂	4-CH ₃	2,73	4,5
6	5-Br	3,4-Cl ₂	5,45	6,9	17	3-CH ₃	4-Cl	4,55	8
7	4-Cl	4-Br	4,89	6,7	18	H	3-Cl	4,06	7,6
8	H	4- <i>terc</i> -butyl	5,21	7,5	19	4-OCH ₃	3-Cl	3,94	7,3
9	5-Cl	H	4,06	7	20	4-CH ₃	4-Cl	4,55	7,7
10	H	4-CH ₃	3,99	7,5	21	4-CH ₃	4- <i>terc</i> -butyl	5,7	7,7
11	H	4-F	3,66	7,6					

K testování byly zvoleny následující organismy: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*. Jako standard, s jehož antifungální aktivitou jsme naše sloučeniny srovnávali, byl zvolen flukonazol. Nejvíce aktivní testované sloučeniny vykazovaly antifungální

aktivitu v rozmezí 0,98–62,5 $\mu\text{mol/l}$. Nejvyšší aktivitu vykazovaly sloučeniny 5-brom-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamid (2), 5-brom-*N*-(3-brombenzyl)thiosalicylamid (4), 5-chlor-*N*-(3,4-dichlorbenzyl)thiosalicylamid (5), 5-brom-*N*-(3,4-dichlorbenzyl)thiosalicylamid (6) a 4-chlor-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamid (7) (Tabulka 40). Přehled biologické aktivity ostatních derivátů je v tabulce 41.

Tabulka 40: Přehled sloučenin s nejvyšší antifungální aktivitou

	MIC ($\mu\text{mol/l}$) 24 h/48 h					
	2	4	5	6	7	Flu
<i>Candida albicans</i>	15,62/	15,62/	31,25/	15,62/	15,62/	1(\pm 1)/
ATCC 44859	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	2(\pm 1)
<i>Candida tropicalis</i>	31,25/	15,62/	31,25/	31,25/	31,25/	3(\pm 1)/
156	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	5(\pm 2)
<i>Candida krusei</i> E28	3,9/	3,9/	3,9/	7,81/	3,9/	>50/
	15,62	7,81	15,62	15,62	15,62	>50
<i>Candida glabrata</i>	31,25/	7,81/	31,25/	31,25/	31,25/	22(\pm 6)/
20/I	125	31,25	31,25	62,5	31,25	>50
<i>Trichosporon asahii</i>	3,9/	15,62/	3,9/	3,9/	7,81/	4(\pm 2)/
1188	7,81	31,25	7,81	7,81	7,81	9(\pm 3)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15,62/	7,81/	3,9/	7,81/	7,81/	>50/
231	15,62	15,62	15,62	7,81	7,81	>50
<i>Absidia corymbifera</i>	3,9/	3,9/	3,9/	3,9/	0,98/	>50/
272	3,9	3,9	7,81	3,9	1,95	>50
<i>Trichophyton</i>	15,62/	1,95/	0,98/	0,98/	0,98/	17(\pm 6)/
<i>mentagrophytes</i> 445*	31,25	1,95	0,98	0,98	1,95	26(\pm 1)

*72 h/120 h, Flu: flukonazol

Jelikož mezi nejaktivnější deriváty patří sloučeniny substituované halogenem, rozhodli jsme se souvislost mezi antifungální aktivitou a substitucí halogenem potvrdit pomocí QSAR výpočtů. K prošetření vztahů mezi antifungální aktivitou a strukturou sloučenin byla použita korelace podle Hansche. Výsledkem byla tříparametrová regresní rovnice. Prvním parametrem byla Hammettova konstanta σ substituentu v thioacylové části molekuly, druhým parametrem pak indikátorová proměnná vyjadřující přítomnost halogenu v celé molekule ($I = 1$). Třetím parametrem byla lipofilita molekuly vyjádřena jako $\log P$ nebo R_M .

Tabulka 41: Antifungální aktivita

	MIC ($\mu\text{mol/l}$) 24 h/48 h																	Flu
	1	3	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	15,62/ 31,25	31,25/ 125	>500/ >500	62,5/ 125	62,5/ 125	62,5/ 125	125/ 250	62,5/ 125	125/ 250	62,5/ 250	500/ >500	62,5/ 125	125/ 125	125/ 250	>500/ >500	>500/ >500	1(\pm 1)/ 2(\pm 1)	
<i>Candida tropicalis</i> 156	31,25/ 31,25	62,5/ 125	>500/ >500	62,5/ 125	125/ 125	125/ 250	125/ 250	125/ 250	125/ 500	250/ 250	>500/ >500	125/ 250	125/ 125	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	3(\pm 1)/ 5(\pm 2)	
<i>Candida krusei</i> E28	15,62/ 31,25	7,81/ 15,62	>500/ >500	15,62/ 31,25	62,5/ 125	62,5/ 125	125/ 250	62,5/ 125	62,5/ 125	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	62,5/ 125	125/ 125	>500/ >500	>500/ >500	>50/ >50	
<i>Candida glabrata</i> 20/1	31,25/ 31,25	62,5/ 125	>500/ >500	15,62/ 62,5	125/ 125	125/ 250	125/ 250	125/ 250	125/ 500	500/ 500	>500/ >500	>500/ >500	125/ 250	250/ 500	>500/ >500	>500/ >500	22(\pm 6)/ >50	
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	15,62/ 15,62	7,81/ 15,62	250/ 250	31,25/ 31,25	31,25/ 62,5	31,25/ 62,5	31,25/ 62,5	62,5/ 62,5	31,25/ 62,5	250/ 250	500/ 500	62,5/ 62,5	31,25/ 31,25	31,25/ 62,5	>500/ >500	>500/ >500	4(\pm 2)/ 9(\pm 3)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	15,62/ 31,25	31,25/ 15,62	250/ >500	31,25/ 31,25	125/ 250	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	62,5/ 125	125/ 500	250/ 500	500/ 500	62,5/ 125	62,5/ 62,5	62,5/ 125	>500/ >500	>500/ >500	>50/ >50	
<i>Absidia corymbifera</i> 272	7,81/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 62,5	15,62/ 15,62	15,62/ 31,25	15,62/ 31,25	62,5/ 15,62	7,81/ 31,25	7,81/ 31,25	62,5/ 250	500/ 500	31,25/ 31,25	31,25/ 31,25	7,81/ 7,81	>500/ >500	>500/ >500	>50/ >50	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445*	7,81/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	1,95/ 3,9	31,25/ 15,62	7,81/ 31,25	15,62/ 15,62	31,25/ 31,25	15,62/ 15,62	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	15,62/ 15,62	7,81/ 15,62	7,81/ 15,62	>500/ >500	>500/ >500	17(\pm 6)/ 26(\pm 1)	

*72 a 120 h, Flu: flukonazol

Výsledky multilineární regresní analýzy (Tabulka 42 a 43) skutečně potvrdily závislost antifungální aktivity na přítomnosti halogenu v molekule. Dle výpočtů vzrůstá antifungální aktivita také s rostoucí lipofilitou a ve většině případů i s rostoucí hodnotou konstanty polarit σ .

Tabulka 42: Výsledky analýzy dle Hansche

Výsledky analýzy dle Hansche	
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 24h	log MIC = - 0,440 ($\pm 0,109$) log <i>P</i> - 0,145 ($\pm 0,161$) I + 0,021 ($\pm 0,233$) σ + 3,699 ($\pm 0,422$) R = 0,83 s = 0,259 F = 10,45 n = 18
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 48h	log MIC = - 0,392 ($\pm 0,118$) log <i>P</i> - 0,135 ($\pm 0,131$) I - 0,267 ($\pm 0,304$) σ + 3,801 ($\pm 0,497$) R = 0,87 s = 0,200 F = 13,91 n = 17
<i>Candida tropicalis</i> 156; 24h	log MIC = - 0,318 ($\pm 0,086$) log <i>P</i> - 0,097 ($\pm 0,097$) I - 0,476 ($\pm 0,224$) σ + 3,360 ($\pm 0,365$) R = 0,92 s = 0,148 F = 24,18 n = 17
<i>Candida tropicalis</i> 156; 48h	log MIC = - 0,292 ($\pm 0,155$) log <i>P</i> - 0,153 ($\pm 0,173$) I - 0,478 ($\pm 0,401$) σ + 3,498 ($\pm 0,655$) R = 0,80 s = 0,264 F = 7,71 n = 17
<i>Candida krusei</i> E28; 24h	log MIC = - 0,444 ($\pm 0,127$) log <i>P</i> - 0,190 ($\pm 0,144$) I - 1,232 ($\pm 0,346$) σ + 3,588 ($\pm 0,537$) R = 0,95 s = 0,210 F = 41,07 n = 16
<i>Candida krusei</i> E28; 48 h	log MIC = - 0,331 ($\pm 0,113$) log <i>P</i> - 0,249 ($\pm 0,129$) I - 0,913 ($\pm 0,309$) σ + 3,418 ($\pm 0,480$) R = 0,95 s = 0,188 F = 33,19 n = 16
<i>Candida glabrata</i> 20/I; 24h	log MIC = - 0,230 ($\pm 0,149$) log <i>P</i> - 0,090 ($\pm 0,170$) I - 1,088 ($\pm 0,407$) σ + 2,998 ($\pm 0,632$) R = 0,88 s = 0,247 F = 14,26 n = 16
<i>Candida glabrata</i> 20/I; 48h	log MIC = - 0,244 ($\pm 0,183$) log <i>P</i> - 0,116 ($\pm 0,208$) I - 0,798 ($\pm 0,499$) σ + 3,327 ($\pm 0,776$) R = 0,80 s = 0,304 F = 7,15 n = 16

Tabulka 43: Výsledky analýzy dle Hansche

Výsledky analýzy dle Hansche	
<i>Trichosporon</i> <i>asahii</i> 1188; 24h	log MIC = - 0,386 ($\pm 0,146$) log <i>P</i> - 0,560 ($\pm 0,218$) I - 0,174 ($\pm 0,360$) σ + 3,500 ($\pm 0,599$) R = 0,80 s = 0,400 F = 8,69 n = 19
<i>Trichosporon</i> <i>asahii</i> 1188; 48h	log MIC = - 0,335 ($\pm 0,118$) log <i>P</i> - 0,550 ($\pm 0,176$) I - 0,140 ($\pm 0,290$) σ + 3,427 ($\pm 0,484$) R = 0,83 s = 0,323 F = 11,35 n = 19
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> 231; 24h	log MIC = - 0,394 ($\pm 0,114$) log <i>P</i> - 0,577 ($\pm 0,170$) I - 0,277 ($\pm 0,281$) σ + 3,749 ($\pm 0,468$) R = 0,87 s = 0,313 F = 15,62 n = 19
<i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i> 231; 48h	log MIC = - 0,403 ($\pm 0,126$) log <i>P</i> - 0,525 ($\pm 0,186$) I - 0,594 ($\pm 0,270$) σ + 3,925 ($\pm 0,488$) R = 0,90 s = 0,299 F = 18,85 n = 18
<i>Absidia</i> <i>corymbifera</i> 272; 24h	log MIC = - 0,582 ($\pm 0,133$) log <i>P</i> - 0,321 ($\pm 0,198$) I + 0,452 ($\pm 0,327$) σ + 3,798 ($\pm 0,545$) R = 0,83 s = 0,364 F = 10,92 n = 19
<i>Absidia</i> <i>corymbifera</i> 272; 48 h	log MIC = - 0,480 ($\pm 0,132$) log <i>P</i> - 0,524 ($\pm 0,197$) I + 0,091 ($\pm 0,325$) σ + 3,699 ($\pm 0,542$) R = 0,84 s = 0,362 F = 11,68 n = 19
<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> 445; 72h	log MIC = - 0,375 ($\pm 0,136$) log <i>P</i> - 0,488 ($\pm 0,202$) I - 0,404 ($\pm 0,333$) σ + 2,945 ($\pm 0,555$) R = 0,81 s = 0,371 F = 9,74 n = 19
<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> 445; 120h	log MIC = - 0,453 ($\pm 0,141$) log <i>P</i> - 0,212 ($\pm 0,210$) I - 0,459 ($\pm 0,347$) σ + 3,213 ($\pm 0,577$) R = 0,77 s = 0,386 F = 7,34 n = 19

Abychom potvrdili správnost našich výpočtů, stanovili jsme dodatečně antifungální aktivitu *N*-benzyl-5-methoxythiosalicylamidu a experimentálně stanovenou MIC porovnali s MIC vypočítanou (Tabulka 44).

Tabulka 44: Porovnání vypočítané a experimentálně stanovené antifungální aktivity pro *N*-benzyl-5-methoxythiosalicylamid

	log MIC / log MIC vyp.; 24 h	log MIC / log MIC vyp.; 48 h
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	2,10 / 2,21	2,40 / 2,48
<i>Candida tropicalis</i> 156	2,40 / 2,29	2,40 / 2,51
<i>Candida krusei</i> E28	2,40 / 2,09	2,40 / 2,30
<i>Candida glabrata</i> 20/I	2,40 / 2,22	2,40 / 2,50
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	2,10 / 2,20	2,40 / 2,29
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	2,40 / 2,42	2,40 / 2,56
<i>Absidia corymbifera</i> 272	1,49 / 1,83	2,10 / 2,08
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445	1,80 / 1,68 ^a	1,80 / 1,68 ^b

^a72 h; ^b120 h

Dle našich předpokladů i výsledků výpočtů se mělo jednat o sloučeninu spíše střední aktivity v porovnání s ostatními deriváty. Výsledky testování skutečně naše domněnky potvrdily. Sloučenina vykazovala střední aktivitu a mezi skutečnými a vypočítanými hodnotami log MIC se nevyskytovaly výrazné rozdíly.

Tenkovrstvá chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi byla opět použita k ověření vypovídací hodnoty log *P*. Mobilní fází byl fosfátový pufr (pH 7,4) s acetonem. Koncentrace acetonu byla volena od 50 do 80 %. Hodnoty R_M byly z experimentálně získaných retenčních faktorů R_F vypočítány podle rovnice $R_M = \log(1/R_F - 1)$. Mezi hodnotami R_M a složením mobilní fáze byl nalezen lineární vztah, což umožnilo extrapolaci na nulovou hodnotu acetonu. Hodnoty R_M a R_M^0 jsou uvedeny v tabulce 45.

Jelikož lineární regresní analýza potvrdila vzájemnou závislost mezi R_M a log *P* (Tabulka 46), dosadili jsme do našeho předchozího QSAR výpočtu namísto log *P* experimentálně získané hodnoty R_M . Korelační koeficienty výsledných regresních rovnic se téměř nezměnily (Tabulka 47 a 48).

U studovaných sloučenin jsme také studovali vliv pK_a na antifungální aktivitu. K výpočtu pK_a byl použit na internetu dostupný program SPARC 4.5. Za podmínek kultivace (35 °C, pH 7,00) by se nejaktivnější sloučeniny měly nacházet v kultivačním médiu z 54–66 % ve své deprotonované formě. Pro antifungální aktivitu bylo nalezeno optimum pK_a mezi hodnotami 6,7–6,9. Sloučeniny s nižší antifungální aktivitou vykazovaly buď nižší nebo naopak vyšší hodnoty pK_a než je toto rozmezí.

Tabulka 45: R_M a R_M^0

	R_M							
	aceton (%)							
	80	75	70	65	60	55	50	0
1	-0,22	-0,05	0,12	0,37	0,57	0,83	1,12	3,29
2	-0,19	0,01	0,21	0,48	0,71	0,95	1,28	3,64
3	-0,27	-0,07	0,1	0,35	0,57	0,83	1,08	3,3
4	-0,2	0	0,19	0,46	0,67	0,93	1,25	3,58
5	-0,16	0,03	0,25	0,51	0,75	1,03	1,31	3,74
6	-0,13	0,06	0,27	0,56	0,8	1,12	1,34	3,87
7	-0,18	0,03	0,21	0,52	0,74	1	1,28	3,69
8	-0,15	0,05	0,25	0,51	0,75	1,09	1,25	3,68
9	-0,26	-0,07	0,18	0,35	0,61	0,81	1,04	3,21
10	-0,26	-0,1	0,05	0,29	0,48	0,69	0,99	2,97
11	-0,32	-0,14	0,02	0,23	0,39	0,59	0,94	2,84
12	-0,26	-0,08	0,09	0,29	0,49	0,72	0,97	2,96
13	-0,26	-0,08	0,09	0,29	0,49	0,7	0,92	2,87
14	-0,2	-0,02	0,14	0,37	0,59	0,83	1,04	3,12
15	-0,33	-0,15	0	0,22	0,37	0,62	0,8	2,67
16	-0,5	-0,31	-0,19	-0,13	0,05	0,34	0,56	2,16
17	-0,17	0,07	0,25	0,52	0,74	0,95	1,19	3,46
18	-0,32	-0,12	0,12	0,27	0,53	0,7	0,94	3,01
19	-0,28	-0,1	0,16	0,31	0,58	0,74	0,94	3,01
20	-0,24	0,03	0,19	0,39	0,67	0,87	1,08	3,26
21	-0,13	0,04	0,31	0,5	0,87	1,16	1,34	3,93

Tabulka 46: Vzájemná závislost mezi R_M a $\log P$

% aceton	rovnice	r	s	F	n
50	$R_M = 0,264 (\pm 0,015) \log P - 0,088 (\pm 0,066)$	0,97	0,049	321,07	21
55	$R_M = 0,262 (\pm 0,015) \log P - 0,325 (\pm 0,069)$	0,97	0,051	285,91	21
60	$R_M = 0,230 (\pm 0,020) \log P - 0,425 (\pm 0,090)$	0,94	0,066	131,26	21
65	$R_M = 0,194 (\pm 0,019) \log P - 0,492 (\pm 0,085)$	0,92	0,063	104,44	21
70	$R_M = 0,142 (\pm 0,014) \log P - 0,483 (\pm 0,064)$	0,92	0,047	98,43	21
75	$R_M = 0,114 (\pm 0,012) \log P - 0,549 (\pm 0,053)$	0,91	0,039	90,65	21
80	$R_M = 0,108 (\pm 0,010) \log P - 0,715 (\pm 0,043)$	0,93	0,032	124,62	21

Tabulka 47: Hanschova analýza s použitím R_M hodnot

Výsledky analýzy dle Hansche	
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 24h	log MIC = - 1,694 ($\pm 0,380$) R_M - 0,055 ($\pm 0,162$) I - 0,010 ($\pm 0,224$) σ + 3,538 ($\pm 0,349$) r = 0,85 s = 0,245 F = 12,21 n = 18
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 48h	log MIC = - 1,523 ($\pm 0,506$) R_M - 0,090 ($\pm 0,141$) I - 0,211 ($\pm 0,336$) σ + 3,690 ($\pm 0,514$) r = 0,86 s = 0,210 F = 12,34 n = 17
<i>Candida tropicalis</i> 156; 24h	log MIC = - 1,120 ($\pm 0,402$) R_M - 0,069 ($\pm 0,112$) I - 0,479 ($\pm 0,267$) σ + 3,156 ($\pm 0,408$) r = 0,90 s = 0,167 F = 17,98 n = 17
<i>Candida tropicalis</i> 156; 48h	log MIC = - 1,082 ($\pm 0,653$) R_M - 0,123 ($\pm 0,181$) I - 0,459 ($\pm 0,434$) σ + 3,364 ($\pm 0,664$) r = 0,79 s = 0,271 F = 7,12 n = 17
<i>Candida krusei</i> E28; 24h	log MIC = - 2,112 ($\pm 0,513$) R_M - 0,157 ($\pm 0,133$) I - 0,919 ($\pm 0,359$) σ + 3,859 ($\pm 0,524$) r = 0,96 s = 0,193 F = 49,64 n = 16
<i>Candida krusei</i> E28; 48 h	log MIC = - 1,479 ($\pm 0,497$) R_M - 0,226 ($\pm 0,129$) I - 0,728 ($\pm 0,347$) σ + 3,526 ($\pm 0,508$) r = 0,95 s = 0,187 F = 33,74 n = 16
<i>Candida glabrata</i> 20/I; 24h	log MIC = - 0,888 ($\pm 0,675$) R_M - 0,078 ($\pm 0,175$) I - 1,030 ($\pm 0,471$) σ + 2,931 ($\pm 0,689$) r = 0,88 s = 0,253 F = 13,43 n = 16
<i>Candida glabrata</i> 20/I; 48h	log MIC = - 1,336 ($\pm 0,776$) R_M - 0,092 ($\pm 0,201$) I - 0,537 ($\pm 0,543$) σ + 3,655 ($\pm 0,793$) r = 0,82 s = 0,291 F = 8,11 n = 16

Tabulka 48: Hanschova analýza s použitím R_M hodnot

Výsledky analýzy dle Hansche	
<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 24h	log MIC = - 1,492 ($\pm 0,539$) R_M - 0,477 ($\pm 0,226$) I - 0,202 ($\pm 0,354$) σ + 3,363 ($\pm 0,525$) r = 0,80 s = 0,394 F = 9,13 n = 19
<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 48h	log MIC = - 1,301 ($\pm 0,433$) R_M - 0,477 ($\pm 0,182$) I - 0,164 ($\pm 0,284$) σ + 3,313 ($\pm 0,421$) r = 0,84 s = 0,316 F = 12,05 n = 19
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 24h	log MIC = - 1,495 ($\pm 0,424$) R_M - 0,499 ($\pm 0,118$) I - 0,305 ($\pm 0,278$) σ + 3,582 ($\pm 0,412$) r = 0,87 s = 0,310 F = 16,08 n = 19
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 48h	log MIC = - 1,566 ($\pm 0,446$) R_M - 0,440 ($\pm 0,190$) I - 0,623 ($\pm 0,259$) σ + 3,786 ($\pm 0,409$) r = 0,90 s = 0,288 F = 20,82 n = 18
<i>Absidia corymbifera</i> 272; 24h	log MIC = - 2,181 ($\pm 0,498$) R_M - 0,212 ($\pm 0,209$) I + 0,410 ($\pm 0,327$) σ + 3,524 ($\pm 0,484$) R = 0,83 s = 0,363 F = 10,94 n = 19
<i>Absidia corymbifera</i> 272; 48 h	log MIC = - 1,824 ($\pm 0,489$) R_M - 0,429 ($\pm 0,205$) I + 0,057 ($\pm 0,321$) σ + 3,496 ($\pm 0,475$) r = 0,84 s = 0,357 F = 12,11 n = 19
<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> 445; 72h	log MIC = - 1,440 ($\pm 0,501$) R_M - 0,410 ($\pm 0,210$) I - 0,430 ($\pm 0,329$) σ + 2,801 ($\pm 0,487$) r = 0,82 s = 0,366 F = 10,13 n = 19
<i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> 445; 120h	log MIC = - 1,732 ($\pm 0,520$) R_M - 0,120 ($\pm 0,218$) I - 0,492 ($\pm 0,342$) σ + 3,032 ($\pm 0,506$) r = 0,78 s = 0,380 F = 7,69 n = 19

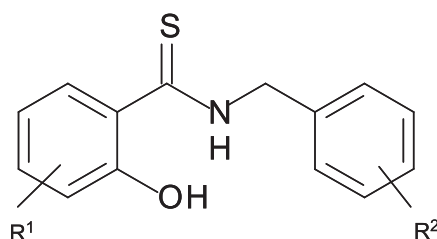
Podíl na publikaci

Tato práce patřila k mým samostatným úkolům. Na výzkumu vztahů mezi strukturou a antifungální aktivitou *N*-benzylthiosalicylamidů se společně se mnou nepodílel žádný jiný student.

4.9. Antibakteriální aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., DUFKOVÁ, I.: Antibacterial Activity of *N*-Benzylsalicylthioamides, *Folia Microbiol.* 2010, in press.

N-Benzylthiosalicylamidy vykazují jak antimykobakteriální, tak i antifungální aktivitu. Abychom objasnili, zda je účinek těchto sloučenin obecný, provedli jsme jejich další testování. K biologickým testům byly použity jednak bakteriální kmeny pocházející z České sbírky mikroorganismů (Brno), jednak bakterie klinicky izolované (Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Hradci Králové). Ze sbírkových kmenů byla aktivita *N*-benzylthiosalicylamidů testována proti kmenům *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Klinicky izolovány byly kmeny *S. aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní, *S. epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 a *K. pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní. Tabulka 49 ukazuje přehled sloučenin zařazených do testování antibakteriální aktivity. Antibakteriální aktivita jednotlivých derivátů je uvedena v tabulkách 50 a 51.



Tabulka 49: Přehled derivátů zařazených do testování antibakteriální aktivity

	R ¹	R ²	log P		R ¹	R ²	log P
1	H	3-CH ₃	3,99	13	4-Cl	4-Br	4,89
2	H	3-Cl	4,06	14	4-OCH ₃	H	3,38
3	H	4-CH ₃	3,99	15	4-OCH ₃	3-Cl	3,94
4	H	4- <i>tert</i> -butyl	5,21	16	5-Cl	H	4,06
5	H	4-F	3,66	17	5-Cl	4-F	4,22
6	H	3,4-Cl ₂	4,62	18	5-Cl	3,4-Cl ₂	5,18
7	3-CH ₃	4-Cl	4,55	19	5-Br	3-Br	5,16
8	4-CH ₃	H	3,99	20	5-Br	4-Br	5,16
9	4-CH ₃	3-NO ₂	2,73	21	5-Br	3,4-Cl ₂	5,45
10	4-CH ₃	4-CH ₃	4,48	22	5-NO ₂	4-CH ₃	2,73
11	4-CH ₃	4- <i>tert</i> -butyl	5,7	23	5-OCH ₃	3-NO ₂	2,45
12	4-CH ₃	4-Cl	4,55	24	3,5-Cl ₂	4- <i>tert</i> -butyl	6,33

Tabulka 50. Antibakteriální aktivita aktivnějších derivátů

	MIC (μmol/l) 24 h/48 h													
	4	6	13	16	17	18	19	20	21	24	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	1,95/ 1,95	0,98/ 0,98	0,98/ 1,95	3,9/ 3,9	1,95/ 3,9	0,98/ 1,95	0,98/ 3,9	0,98/ 0,98	0,98/ 1,95	0,98/ 1,95	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rezistentní	3,9/ 3,9	1,95/ 1,95	0,98/ 1,95	3,9/ 3,9	1,95/ 3,9	0,98/ 1,95	0,98/ 3,9	0,98/ 0,98	0,98/ 1,95	0,98/ 1,95	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	3,9/ 3,9	1,95/ 1,95	0,98/ 1,95	3,9/ 3,9	1,95/ 3,9	0,98/ 3,9	0,98/ 3,9	0,98/ 0,98	0,98/ 1,95	0,98/ 1,95	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus sp,</i> J 14365/08	7,81/ 31,25	7,81/ 31,25	0,98/ 3,9	7,81/ 31,25	1,95/ 7,81	3,9/ 7,81	3,9/ 31,25	0,98/ 3,9	31,25/ 31,25	1,95/ 3,9	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>500/ >500	250/ 500	31,25/ 31,25	125/ 125	62,5/ 62,5	15,62/ 31,25	7,81/ 31,25	31,25/ 31,25	125/ 125	>500/ >500	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>500/ >500	250/ 500	62,5/ 62,5	250/ 250	31,25/ 31,25	62,5/ 62,5	7,8/ 62,5	31,25/ 31,25	125/ 250	>500/ >500	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	500/ 500	500/ 500	62,5/ 62,5	31,25/ 250	62,5/ 62,5	125/ 125	>500/ >500	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>500/ >500	31,25/ 31,25	7,81/ 7,81	62,5/ 62,5	15,62/ 15,62	1,95/ 3,9	7,81/ 15,62	3,9/ 3,9	15,62/ 15,62	31,25/ 31,25	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacín, Phen: fenoxymethylpenicilin

Tabulka 51: Antibakteriální aktivita méně aktivních derivátů

	MIC (µmol/l) 24 h/48 h														
	1	2	3	5	7	8	9	10	11	12	14	15	22	23	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	7,8/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	15,62/ 31,25	15,62/ 31,25	>500/ >500	7,81/ 7,81	62,5/ 62,5	15,62/ 15,62	7,81/ 7,81	62,5/ 125
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rez.,	15,62/ 31,25	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	15,62/ 31,25	15,62/ 15,62	31,25/ 62,5	62,5/ 62,5	15,62/ 31,25	15,62/ 31,25	>500/ >500	7,81/ 7,81	62,5/ 125	31,25/ 31,25	7,81/ 7,81	62,5/ 125
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> H 6966/08	7,8/ 31,25	15,62/ 15,62	15,62/ 62,5	15,62/ 15,62	15,62/ 31,25	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	15,62/ 31,25	15,62/ 31,25	>500/ >500	15,62/ 15,62	125/ 250	31,25/ 31,25	7,81/ 7,81	125/ 250
<i>Enterococcus</i> sp. J 14365/08	62,5/ 125	62,5/ 62,5	250/ 250	125/ 125	31,25/ 125	62,5/ 125	250/ 500	31,25/ 62,5	31,25/ 62,5	>500/ >500	>500/ >500	250/ 500	62,5/ 125	15,62/ 62,5	250/ 250
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>500/ >500	>500/ >500	500/ 500	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>500/ >500	>500/ >500	250/ 250	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL pozitivní	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	500/ 500	500/ 500	62,5/ 62,5	125/ 125	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	500/ >500	500/ 500	>500/ >500

Neom: neomycin, Pen: penicilin G, Cipr: ciprofloxacin, Phen: fenoxymethylpenicilin

Všechny testované sloučeniny s výjimkou derivátu **11** vykazovaly vysokou aktivitu proti grampozitivním bakteriím. Uvedená antibiotika (neomycin, penicilin G, ciprofloxacin a fenoxyethylpenicilin) byla začleněna do studie antibakteriálních účinků pro porovnání aktivit jednotlivých derivátů.

Testované sloučeniny však většinou nevykazovaly žádnou, nebo velmi malou aktivitu proti gramnegativním bakteriím. Pouze u 5-chlor-*N*-(3,4-dichlorbenzyl)thiosalicylamidu a 5-brom-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamidu byla nalezena významnější aktivita proti kmenu *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (1,95–3,9 μmol/l).

Ke zjištění vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou byla použita korelace podle Hansche. Do výpočtu jsme zařadili pouze MIC pro grampozitivní bakterie (Tabulka 52). Mezi parametry s nejvyšším vlivem na biologickou aktivitu patří lipofilita ($\log P$), Hammettova substituentová konstanta σ , která byla vztažena ke karbonylu acylové části a indikátorová proměnná I vyjadřující přítomnost halogenu jako substituentu R^2 ($I = 1$; v případě jiného R^2 substituentu než halogenu $I = 0$).

Tabulka 52: Hanschova analýza

Výsledky analýzy dle Hansche	
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516; 24h	$\log \text{MIC} = -0,399 (\pm 0,073)$ $\log P = -0,300 (\pm 0,127)$ $I = -1,106 (\pm 0,226)$ $\sigma + 2,788 (\pm 0,295)$ $r = 0,92$ $s = 0,282$ $F = 35,80$ $n = 23$
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516; 48h	$\log \text{MIC} = -0,353 (\pm 0,084)$ $\log P = -0,301 (\pm 0,146)$ $I = -0,895 (\pm 0,259)$ $\sigma + 2,695 (\pm 0,338)$ $r = 0,88$ $s = 0,324$ $F = 20,72$ $n = 23$
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08; 24h	$\log \text{MIC} = -0,378 (\pm 0,054)$ $\log P = -0,288 (\pm 0,094)$ $I = -1,207 (\pm 0,167)$ $\sigma + 2,740 (\pm 0,218)$ $r = 0,96$ $s = 0,209$ $F = 65,73$ $n = 23$
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08; 48h	$\log \text{MIC} = -0,336 (\pm 0,084)$ $\log P = -0,395 (\pm 0,145)$ $I = -1,174 (\pm 0,258)$ $\sigma + 2,825 (\pm 0,337)$ $r = 0,90$ $s = 0,323$ $F = 26,52$ $n = 23$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966; 24h	$\log \text{MIC} = -0,388 (\pm 0,068)$ $\log P = -0,328 (\pm 0,119)$ $I = -1,385 (\pm 0,211)$ $\sigma + 2,877 (\pm 0,276)$ $r = 0,94$ $s = 0,264$ $F = 48,84$ $n = 23$
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966; 48h	$\log \text{MIC} = -0,344 (\pm 0,088)$ $\log P = -0,359 (\pm 0,152)$ $I = -1,229 (\pm 0,270)$ $\sigma + 2,881 (\pm 0,352)$ $r = 0,89$ $s = 0,337$ $F = 24,88$ $n = 23$
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08; 24h	$\log \text{MIC} = -0,393 (\pm 0,122)$ $\log P = -0,264 (\pm 0,215)$ $I = -1,345 (\pm 0,388)$ $\sigma + 3,303 (\pm 0,491)$ $r = 0,84$ $s = 0,470$ $F = 14,45$ $n = 22$
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08; 48h	$\log \text{MIC} = -0,350 (\pm 0,085)$ $\log P = -0,228 (\pm 0,149)$ $I = -1,112 (\pm 0,269)$ $\sigma + 3,442 (\pm 0,341)$ $r = 0,89$ $s = 0,326$ $F = 22,26$ $n = 22$

5-Brom-*N*-(4-brombenzyl)thiosalicylamid je nejaktivnějším derivátem z připravené skupiny sloučenin. Je stejně účinný nebo účinnější než standardní antibiotika proti kmenům *S. epidermidis*, *Enterococcus* a methicilin rezistentnímu kmenu *S. aureus*.

Ze skutečnosti, že *N*-benzylthiosalicylamidy nevykazují aktivitu vůči gramnegativním bakteriím, lze usuzovat, že jejich účinek je určitým způsobem specifický a že se nejedná o obecnou toxicitu. Nicméně pro další výzkum těchto sloučenin je nutné stanovení vedlejších účinků, zejména toxicity vůči zdravým buněčným liniím.

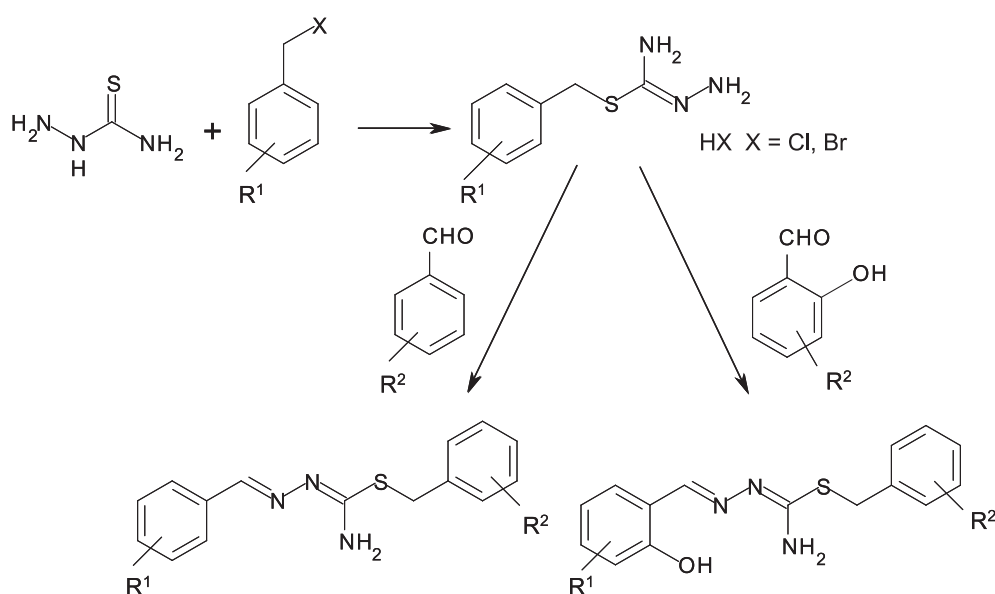
Podíl na publikaci

Tato práce patřila k mým samostatným úkolům.

4.10. Nové *S*-benzylisothiosemikarbazony s antimykobakteriální aktivitou

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., STOLAŘÍKOVÁ, J.: New *S*-Benzylisothiosemicarbazones with Antimycobacterial Activity. *Folia Microbiol.*, under review. (publikace zahrnuje informace týkající se antimykobakteriální aktivity, syntéza sloučenin a jejich experimentální data budou později publikovány v časopise s chemickou tematikou).

S-alkylisothiosemikarbazony patří mezi sloučeniny s antimykobakteriální a antivirotickou aktivitou (133, 134, 135). Farmakoforem zodpovědným za biologickou aktivitu je pravděpodobně alkylsulfanylová skupina (136). Dr. Heinsch věnoval výzkumu isothiosemikarbazonů mnoho pozornosti (133, 134, 135), našim cílem bylo na jeho výzkum navázat a připravit sérii *S*-benzylisothiosemikarbazonů.



Obrázek 100: Syntéza *S*-benzylisothiosemikarbazonů

Syntéza (Obr. 100)

Příprava *S*-benzylisothiosemikarbazidů

S-benzylisothiosemikarbazidy byly v podobě svých hydrohalogenidů připraveny zahříváním isothiosemikarbazidu (1 mol) s příslušně substituovaným benzylchloridem nebo

benzylbromidem (1 mol) po 60 až 90 minut pod zpětným chladičem. Jako rozpouštědlo byl použit ethanol (50 ml). Po ochlazení na pokojovou teplotu byl výsledný produkt oddělen filtrací a přečištěn krystalizací z ethanolu.

Příprava *S*-benzylisothiosemikarbazonů

S-benzylisothiosemikarbazid-hydrohalogenid (1 mol) byl společně s benzaldehydem (1 mol) nebo salicylaldehydem (1 mol) zahříván po dobu deseti minut pod zpětným chladičem. Jako rozpouštědlo byl opět použit ethanol (50 ml). Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo k reakční směsi přidáno 50 ml vody a reakční produkt byl oddělen filtrací. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze chloroform) byl výsledný produkt v podobě dvou izomerů krystalizován z methanolu. Tyto dva izomery se nepodařilo od sebe oddělit. Benzaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazony a 5-bromsalicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl) isothiosemikarbazon byly izolovány v podobě hydrohalogenidů.

Stanovení fyzikálních vlastností

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. Vzorky k analýze a biologickému hodnocení byly sušeny 12 hodin nad oxidem fosforečným při tlaku 66 Pa a teplotě 68 °C. Elementární analýza byla provedena na C, H, N, S – analyzátoru FISON S AE 1110 (Milano). Infračervená spektra byla měřena v KBr na přístroji NICOLET IMPACT 400. NMR spektra byla změřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300, pracujícím při 300 MHz pro ^1H a 75 MHz pro ^{13}C . Jako rozpouštědlo pro měření NMR byl použit DMSO. Průběh reakce a čistota výsledných produktů byly kontrolovány pomocí TLC (silikagelové desky s fluorescenčním indikátorem Silufol UV 254 + 366, Kavalier, Votice, ČR).

Připravené deriváty

Benzaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazon-hydrochlorid (1a), výtěžek 65 %, t.t. 174–177 °C, IR (ν NH₂) 1645 cm⁻¹; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,86 (2H, bs, NH₂), 8,61 (1H, s, CH), 7,95–7,88 (2H, m, Ar), 7,55–7,26 (8H, m, Ar), 4,78 (2H, s, CH₂); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,4, 152,5, 135,8, 132,9, 131,8, 129,3, 129,0, 129,0, 128,6, 128,2, 35,0; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₅N₃S.HCl (305,83): C 58,91; H 5,27; N 13,74; S 10,48 %, Nalezeno: C 58,58; H 5,32; N 13,54; S 10,83 %.

Benzaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon-hydrochlorid (1b), výtěžek 82%, t.t. 158–161 °C, IR (ν NH₂) 1644 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,59 (1H, s, CH), 7,94–7,87 (2H, m, Ar), 7,62–7,32 (9H, m, Ar + NH₂), 4,78 (2H, s, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,0, 152,7, 138,8, 133,3, 133,0, 131,7, 130,8, 129,1, 129,0, 128,6, 128,1 127,9, 34,0; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄ClN₃S.HCl (340,27): C 52,95; H 4,44; N 12,35; S 9,42 %, Nalezeno: C 53,33; H 4,41; N 12,66; S 9,02 %,

Benzaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon-hydrochlorid (1c), výtěžek 72 %, t.t. 166–169 °C, IR (ν NH₂) 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,87 (2H, bs, NH₂), 8,61 (1H, s, CH), 7,95–7,88 (2H, m, Ar), 7,55–7,41 (3H, m, Ar), 7,39–7,32 (2H, m, AA', BB', Ar), 7,20–7,12 (2H, m, AA', BB', Ar), 4,73 (2H, s, CH₂), 2,26 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5, 152,5, 137,6 132,9, 132,6, 131,8, 129,6, 129,1, 128,8, 128,7, 34,9, 20,9; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₇N₃S.HCl (319,85): C 60,08; H 5,67; N 13,14; S 10,02 %, Nalezeno: C 60,30; H 5,70; N 12,85; S 9,69 %.

Benzaldehyd-*S*-[4-(trifluormethyl)benzyl]isothiosemikarbazon-hydrochlorid (1d), výtěžek 74 %, t.t. 164–168 °C, IR (ν NH₂) 1623 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,61 (1H, s, CH), 7,96–7,75 (4H, m, Ar), 7,73–7,56 (3H, m, Ar), 7,54–7,39 (4H, m, Ar + NH₂), 4,90 (2H, s, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,0, 152,7, 137,8, 133,4, 132,9, 131,8, 130,1, 129,7, 129,3, 129,0, 128,6, 126,0, 125,9, 125,9, 124,9, 124,9, 122,4, 34,1; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₄F₃N₃S.HCl (372,82): C 51,41; H 4,04; N 11,24; S 8,58 %, Nalezeno: C 51,60; H 3,91; N 10,97; S 8,39 %.

Benzaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon-hydrobromid (1e), výtěžek 61 %, t.t. 171–175 °C, IR (ν NH₂) 1635 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,72 (2H, bs, NH₂), 8,39 (1H, s, CH), 7,95–7,89 (2H, m, Ar), 7,62–7,37 (7H, m, Ar), 4,65 (2H, s, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,2, 152,9, 135,4, 132,8, 132,0, 131,9, 131,4, 129,1, 128,7, 121,5, 34,3; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄BrN₃S.HBr (429,17): C 41,98; H 3,52; N 9,79; S 7,47 %, Nalezeno: C 42,03; H 3,74; N 9,53; S 7,34 %.

Salicylaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazon (2a), směs izomerů cca 1:1, výtěžek 56 %, t.t. 134–136 °C, IR (ν NH₂) 1630 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,62 (1H, bs, OH, A), 10,68 (1H, bs, OH, B), 8,56 (1H, s, CH, A), 8,33 (1H, s, CH, B), 7,76–7,66 (1H, m, Ar, A), 7,46–7,04 (8H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,95–6,78 (2H, m, Ar, A + B), 4,38 (2H, s, CH₂, A), 4,29

(2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,9, 160,9, 157,9, 157,7, 152,2, 136,6, 131,8, 130,6, 129,3, 129,2, 128,9, 128,7, 127,6, 127,6, 119,4, 119,3, 119,1, 116,3, 116,2, 33,6; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₅N₃OS (285,37): C 63,13; H 5,30; N 14,72; S 11,24 %, Nalezeno: C 63,07; H 5,20; N 14,97; S 11,42 %.

Salicylaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2b), směs izomerů 1:1; výtěžek 63 %, t.t. 125–128 °C, IR (ν NH₂) 1641 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,49 (1H, bs, OH, B), 11,69 (1H,bs, OH, A), 8,54 (1H, s, CH, A), 8,32 (1H, s, CH, B), 7,79–7,57 (1H, m, Ar, A), 7,49 (1H, s, Ar, A + B), 7,42–7,16 (5H, m, Ar, A + B), 7,08 (2H, bs, NH₂, A), 6,92–6,80 (4H, m, Ar, A + B, + NH₂, B), 4,34 (2H, s, CH₂, B), 4,30 (2H, s, CH₂, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,3, 157,9, 157,7, 152,5 139,7, 133,3, 133,1, 130,8, 130,6, 129,0, 128,0, 127,6, 119,6, 119,4, 119,1, 116,3, 35,6, 32,8; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄ClN₃OS (319,82): C 56,33; H 4,41; N 13,14; S 10,03 %, Nalezeno: C 56,50; H 4,32; N 13,32; S 10,34 %.

Salicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon (2c), směs izomerů cca 1:1; výtěžek 44 %, t.t. 127–129 °C, IR (ν NH₂) 1639 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,53 (1H, bs, OH, B), 10,81 (1H, bs, OH, A), 8,51 (1H, s, CH, A), 8,32 (1H, s, CH, B), 7,62–7,32 (3H, m, Ar, A + B), 7,29–6,96 (5H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,93–6,80 (2H, m, Ar, A + B), 4,29 (2H, s, CH₂, B), 4,27 (2H, s, CH₂, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,6, 159,9, 157,9, 157,6, 154,3, 152,3, 134,9, 134,8, 133,0, 133,0, 131,3, 131,2, 131,2, 131,1, 130,8, 130,6, 130,5, 119,7, 119,4, 119,3, 119,1, 116,1, 115,8, 115,5, 115,4, 115,2, 32,7, 32,3; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄FN₃OS (303,36): C 59,39; H 4,65; N 13,85; S 10,57 %, Nalezeno: C 59,67; H 4,77; N 14,21; S 10,29 %.

Salicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2d); směs izomerů cca 1:1; výtěžek 42 %, t.t. 155–156 °C, IR (ν NH₂) 1643 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,52 (1H, bs, OH, B), 10,79 (1H, bs, OH, A), 8,50 (1H, s, CH, A), 8,32 (1H, s, CH, B), 7,62–7,18 (6H, m, Ar, A + B), 7,05 (2H, bs, NH₂, A), 6,98 (2H, bs, NH₂, B), 6,93–6,80 (2H, m, Ar, A + B), 4,29 (2H, s, CH₂, B), 4,27 (2H, s, CH₂, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,4, 159,7, 157,9, 157,6, 154,4, 152,4, 137,9, 136,1 132,2, 131,8, 131,1, 131,0, 130,8, 130,6, 130,5, 128,8, 128,5, 119,7, 119,4, 119,3, 119,1, 116,2, 32,7, 32,3; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄ClN₃OS (319,82): C 56,33; H 4,41; N 13,14, S 10,03 %, Nalezeno: C 56,35; H 4,41, N 13,07; S 10,31 %.

Salicylaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (2e), směs izomerů 1:1; výtěžek 61 %, t.t. 129–132 °C, IR (ν NH₂) 1637 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,52 (1H, bs, OH, B), 11,79 (1H, bs, OH, A), 8,50 (1H, s, CH, A), 8,32 (1H, s, CH, B), 7,60–7,32 (5H, m, Ar + NH₂, A + B), 7,30–7,17 (1H, m, Ar, A + B), 7,09–6,97 (2H, m, Ar, A + B), 6,92–6,79 (2H, m, Ar, A + B), 4,28 (2H, s, CH₂, B), 4,25 (2H, s, CH₂, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,3, 159,7, 157,9, 157,6, 154,4, 152,4, 138,3, 136,5, 131,7, 131,4, 131,1, 130,8, 130,6, 130,5, 120,7, 120,3, 119,7, 119,4, 119,3, 119,1, 116,2, 32,8, 32,4; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₄BrN₃OS (364,27): C 49,46; H 3,87; N 11,54; S 8,80 %, Nalezeno: C 49,46; H 3,81; N 11,34; S 8,90 %.

5-Chlorsalicylaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2f), směs izomerů cca 1:1,5, výtěžek 47 %, t.t. 165–166 °C, IR (ν NH₂) 1640 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,57 (1H, bs, OH, A), 10,67 (1H, bs, OH, B), 8,47 (1H, s, CH, B), 8,32 (1H, s, CH, A), 7,85–7,78 (1H, m, Ar, B), 7,54–7,08 (8H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,93–6,83 (1H, m, Ar, A + B), 4,31 (2H, s, CH₂, A), 4,28 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 162,8, 156,8, 147,8, 138,7, 133,4, 132,7, 130,9, 129,1, 128,2, 128,0, 126,3, 123,6, 120,8, 118,4, 34,2; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₃Cl₂N₃OS (345,26): C 50,86; H 3,70; N 11,86; S 9,05 %, Nalezeno: C 50,83; H 3,92; N 11,92; S 8,80 %.

5-Chlorsalicylaldehyd-*S*-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon (2g), výtěžek 85 %, t.t. 197–200 °C, IR (ν NH₂) 1627 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,74 (1H, bs, OH), 9,83 (2H, bs, NH₂), 8,72 (1H, s, CH), 8,13 (1H, d, $J = 2,9$ Hz, Ar), 7,37–7,23 (2H, m, Ar), 7,06–7,01 (2H, m, Ar), 6,98 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, Ar), 6,88 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz, $J = 2,9$ Hz, Ar), 4,66 (2H, s, CH₂), 3,74 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,5, 159,6, 159,5, 156,7, 137,1, 130,1, 123,6, 121,4, 120,7, 118,4, 114,9, 113,6, 55,3, 34,9; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₆ClN₃O₂S (349,84): C 54,93; H 4,61; N 12,01; S 9,17 %, Nalezeno: C 55,00; H 4,56; N 12,38; S 9,05 %.

5-Chlorsalicylaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon (2h), směs izomerů 1:1; výtěžek 54 %, t.t. 162–165 °C, IR (ν NH₂) 1641 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,60 (1H, bs, OH, B), 11,73 (1H, bs, OH, A), 8,47 (1H, s, CH, A), 8,30 (1H, s, CH, B), 7,80 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, Ar, A), 7,49 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, Ar, B), 7,32–7,03 (7H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,89 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar, A), 6,84 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, Ar, B), 4,24 (2H, s, CH₂, B), 4,23 (2H, s, CH₂, A), 2,27 (3H, s, CH₃, A), 2,25 (3H, s, CH₃, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B

δ 164,7, 161,1, 156,5, 156,0, 151,0, 150,6, 136,9, 136,4, 135,1, 133,3, 130,4, 129,9, 129,4, 129,2, 129,1, 129,1, 128,4, 123,1, 122,7, 122,0, 120,7, 117,9, 33,4, 33,0, 20,9; Anal. vyp. pro $C_{16}H_{16}ClN_3OS$ (333,84): C 57,57; H 4,83; N 12,59; S 9,60 %, Nalezeno: C 57,59; H 5,27; N 12,27; S 9,52 %.

5-Chlorsalicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon (2i), směs izomerů cca 1:1; výtěžek 77 %; t.t. 148–150 °C, IR (ν NH₂) 1641 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,59 (1H, bs, OH, A), 10,70 (1H, bs, OH, B), 8,47 (1H, s, CH, B), 8,31 (1H, s, CH, A), 7,80 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, Ar, B), 7,50 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, Ar, A), 7,48–7,41 (2H, m, Ar, A + B), 7,28–7,07 (5H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,93–6,82 (1H, m, Ar, A + B), 4,29 (2H, s, CH₂, A), 4,26 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,3, 163,3, 163,0, 160,8, 160,0, 159,8, 156,5, 156,0, 151,0, 150,7, 134,8, 134,8, 133,0, 132,9, 131,3, 131,2, 131,2, 131,1, 130,4, 129,9, 129,5, 128,3, 123,1, 122,8, 122,0, 120,7, 118,0, 115,8, 115,5, 115,4, 115,2, 32,7, 32,2; Anal. vyp. pro $C_{15}H_{13}ClFN_3OS$ (337,81): C 53,33; H 3,88; N 12,44; S 9,49 %, Nalezeno: C 53,27; H 3,84; N 12,16; S 9,17 %.

5-Chlorsalicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2j), směs izomerů cca 1:1; výtěžek 73 %; t.t. 157–159 °C; IR (ν NH₂) 1638 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,58 (1H, bs, OH, A), 10,70 (1H, bs, OH, B), 8,47 (1H, s, CH, B), 8,31 (1H, s, CH, A), 7,83–7,77 (1H, m, Ar, A), 7,52–7,48 (1H, m, Ar, B), 7,48–7,32 (4H, m, Ar, A+B), 7,28–7,20 (1H, m, Ar, A + B), 7,17 (2H, bs, NH₂, A), 7,11 (2H, bs, NH₂, B), 6,94–6,81 (1H, m, Ar, A + B), 4,30 (2H, s, CH₂, A), 4,26 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,2, 160,7, 156,5, 156,0, 151,0, 150,8, 137,8, 136,0 132,3, 131,8, 131,1, 131,0, 130,4, 130,0, 129,5 128,8, 128,5, 128,3, 123,1, 122,8, 122,0, 120,7, 118,0, 32,7, 32,2; Anal. vyp. pro $C_{15}H_{13}Cl_2N_3OS$ (354,26): C 50,86; H 3,70; N 11,86; S 9,05 %, Nalezeno: C 50,85; H 3,64; N 12,04; S 8,88 %.

5-Bromsalicylaldehyd-*S*-(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2k), výtěžek 68 %, t.t. 149–150°C, IR (ν NH₂) 1643 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,79 (1H, bs, OH), 10,79 (2H, bs, NH₂), 8,71–8,61 (1H, s, Ar), 8,28–8,18 (1H, m, Ar), 7,60–7,49 (1H, m, Ar), 7,49–7,32 (4H, m, Ar), 6,96–6,87 (1H, m, Ar), 4,70 (2H, s, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162,9, 157,2, 138,6, 135,6, 133,5, 131,0, 129,2, 128,3, 128,0, 121,3, 118,9, 111,3, 34,3; Anal. vyp. pro $C_{15}H_{13}BrClN_3OS$ (398,71): C 45,19; H 3,29; N 10,54; S 8,04 %, Nalezeno: C 45,27; H 3,45; N 10,74; S 7,81 %.

5-Bromsalicylaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon (2l), směs izomerů cca 1:1, výtěžek 77 %, t.t. 169–172 °C, IR (ν NH₂) 1638 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,63 (1H, bs, OH, A), 10,76 (1H, bs, OH, B), 8,46 (1H, s, CH, A), 8,30 (1H, s, CH, B), 7,92 (1H, d, J = 2,4 Hz, Ar, A), 7,62 (1H, d, J = 2,4 Hz, Ar, B), 7,43–7,23 (3H, m, Ar, A + B), 7,19–7,05 (4H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,89–6,76 (1H, m, Ar, A + B), 4,24 (2H, s, CH₂, A), 4,23 (2H, s, CH₂, B), 2,28 (3H, s, CH₃, A), 2,26 (3H, s, CH₃, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,7, 161,1, 156,9, 156,5, 150,9, 150,5, 136,9, 136,4, 135,1, 133,3, 133,2, 132,7, 132,4, 131,2, 129,4, 129,2, 129,1, 129,1, 122,6, 121,3, 118,4, 110,7, 110,2, 33,4, 33,0, 20,9, 20,9; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₆BrN₃OS (378,29): C 50,80; H 4,26; N 11,11; S 8,48 %, Nalezeno: C 50,94; H 4,26; N 11,13; S 8,23 %.

5-Bromsalicylaldehyd-[*S*-4-(trifluormethyl)benzyl]isothiosemikarbazon (2m), směs izomerů cca 1:1,5; výtěžek 55 %; t.t. 110–111 °C; IR (ν NH₂) 1640 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,59 (1H, bs, OH, A), 10,68 (1H, bs, OH, B), 8,46 (1H, s, CH, B), 8,31 (1H, s, CH, A), 7,92 (1H, d, J = 2,4 Hz, Ar, B), 7,80–7,30 (5H, m, Ar, A + B), 7,20 (2H, bs, NH₂, A), 7,13 (2H, bs, NH₂, B), 6,83 (1H, t, J = 9,4 Hz, Ar, A + B), 4,40 (2H, s, CH₂, A), 4,35 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,8, 160,5, 156,9, 156,4, 150,8, 150,7, 140,6, 138,8, 133,4, 133,2, 132,8, 132,4, 131,1, 129,9, 129,6, 129,5, 129,3, 129,2, 128,9, 126,2, 125,9, 125,8, 125,7, 123,9, 123,8, 122,6, 122,5, 121,3, 118,4, 110,7, 110,2, 32,7, 32,3; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₃BrF₃N₃OS (432,26): C 44,46; H 3,03; N 9,72; S 7,42 %, Nalezeno: C 44,70; H 3,21; N 9,38; S 7,26 %.

5-Bromsalicylaldehyd-*S*-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon-hydrochlorid (2n), směs izomerů cca 1:1; výtěžek 64 %, t.t. 154–156 °C, IR (ν NH₂) 1638 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,61 (1H, bs, OH, A), 10,72 (1H, bs, OH, B), 8,46 (1H, s, CH, B), 8,30 (1H, s, CH, A), 7,92 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, A), 7,62 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, B), 7,49–7,30 (3H, m, Ar, A + B), 7,22–7,06 (4H, m, Ar + NH₂, A + B), 6,88–6,76 (1H, m, Ar, A + B), 4,29 (2H, s, CH₂, A), 4,26 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,3, 160,8, 156,9, 156,5, 150,9, 150,6, 134,8, 134,8, 133,2, 133,0, 132,7, 132,3, 131,3, 131,2, 131,2, 131,1, 122,6, 121,3, 118,4, 115,8, 115,5, 115,4, 115,1, 110,7, 110,2, 32,7, 32,2; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₃BrFN₃OS.HCl (418,71): C 43,03; H 3,37; N 10,04; S 7,66 %, Nalezeno: C 43,39; H 3,41; N 9,90; S 7,72 %.

5-Bromsalicylaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (2o), směs izomerů cca 1:1, výtěžek 68 %, t.t. 191–194 °C, IR (ν NH₂) 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11,61 (1H, bs, OH, A), 10,72 (1H, bs, OH, B), 8,46 (1H, s, CH, B), 8,31 (1H, s, CH, A), 7,95–7,86 (1H, m, Ar, B), 7,65–7,58 (1H, m, Ar, A), 7,58–7,44 (2H, m, Ar, A + B), 7,41–7,29 (3H, m, Ar, A + B), 7,16 (2H, m, NH₂, A), 7,11 (2H, m, NH₂, B), 6,89–6,76 (1H, m, Ar, A + B), 4,28 (2H, s, CH₂, A), 4,25 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,1, 160,6, 157,0, 156,5, 151,0, 150,7, 138,3, 136,4, 133,2, 132,8, 132,4, 131,7, 131,4, 131,2, 122,6, 121,3, 120,8, 120,3, 118,4, 110,7, 110,2, 32,8, 32,3; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₃Br₂N₃OS (443,16): C 40,65; H 2,96; N 9,48; S 7,24 %, Nalezeno: C 40,48; H 2,91; N 9,17; S 7,18 %.

3,5-Dichlorsalicylaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon (2p), směs izomerů cca 1:2, výtěžek 31 %, t.t. 179–180 °C, IR (ν NH₂) 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,51 (1H, bs, OH, A), 11,79 (1H, bs, OH, B), 8,50 (1H, s, CH, B), 8,33 (1H, s, CH, A), 7,66 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, A), 7,54 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, A), 7,51 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, B), 7,48 (1H, d, J = 2,5 Hz, Ar, B), 7,33–7,21 (4H, m, Ar + NH₂, A + B), 7,18–7,08 (2H, m, Ar, A + B), 4,27 (2H, s, CH₂, B), 4,23 (2H, s, CH₂, A), 2,28 (3H, s, CH₃, B), 2,25 (3H, s, CH₃, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 163,7, 153,5, 152,0, 132,6, 129,7, 129,5, 129,2, 123,5, 122,2, 120,5, 50,0, 34,8, 20,9; Anal. vyp. pro C₁₆H₁₅Cl₂N₃OS (368,29): C 52,18; H 4,11; N 11,41; S 8,71 %, Nalezeno: C 51,82; H 4,17; N 11,56; S 8,46 %.

3,5-Dichlorsalicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon (2q), směs izomerů cca 3:2; výtěžek 59 %, t.t. 163–165 °C, IR (ν NH₂) 1639 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,50 (1H, bs, OH, A), 11,74 (1H, bs, OH, B), 8,50 (1H, s, CH, B), 8,34 (1H, s, CH, A), 7,68–7,27 (8H, m, Ar + NH₂, A + B), 4,33 (2H, s, CH₂, A), 4,26 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,9, 161,3, 153,2, 152,5, 152,3, 150,4, 137,6, 135,9, 132,3, 131,8, 131,1, 131,1, 129,9, 129,3, 128,9, 128,9, 128,8, 128,5, 123,1, 122,8, 122,0, 121,3, 121,2, 120,9, 32,8, 32,5; Anal. vyp. pro C₁₅H₁₂Cl₃N₃OS (388,71): C 46,35; H 3,11; N 10,81; S 8,25 %, Nalezeno: C 46,43; H 2,98; N 10,53; S 8,09 %.

3,5-Dichlorsalicylaldehyd-*S*-(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon (2r), směs izomerů cca 4:3, výtěžek 81 %, t.t. 176–178 °C, IR (ν NH₂) 1642 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,50 (1H, bs, OH, A), 11,74 (1H, bs, OH, B), 8,50 (1H, s, CH, B), 8,34 (1H, s, CH, A), 7,74–7,16 (8H, m, Ar + NH₂, A + B), 4,31 (2H, s, CH₂, A), 4,25 (2H, s, CH₂, B); ¹³C NMR

(75 MHz, DMSO), směs A + B δ 164,8, 161,2, 153,2, 152,5, 152,3, 150,4, 138,1, 136,3, 131,8, 131,4, 129,9, 129,4, 128,9, 128,7, 123,1, 122,8, 122,0, 121,3, 121,2, 120,9, 120,8, 120,3, 32,8, 32,5; Anal. vyp. pro $C_{15}H_{12}BrCl_2N_3OS$ (433,16): C 41,59; H 2,79; N 9,70; S 7,40 %, Nalezeno: C 41,95; H 3,00; N 9,33; S 7,37 %.

3,5-Dibromsalicylaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazon (2s), směs izomerů cca 2:3, výtěžek 42 %, t.t. 191–193 °C, IR (ν NH₂) 1636 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,62 (1H, bs, OH, B), 11,96 (1H, bs, OH, A), 8,49 (1H, s, CH, A), 8,32 (1H, s, CH, B), 7,77–7,65 (2H, m, Ar, A + B), 7,46–7,21 (7H, m, Ar + NH₂, A + B), 4,33 (2H, s, CH₂, B), 4,27 (2H, s, CH₂, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 165,2, 161,5, 153,8, 153,7, 153,4, 150,2, 138,1, 136,5, 135,1, 134,5, 132,6, 132,2, 129,3, 129,2, 128,9, 128,6, 127,7, 127,3, 122,2, 121,7, 110,8, 110,6, 110,3, 33,6, 33,4; Anal. vyp. pro $C_{15}H_{13}Br_2N_3OS$ (443,16): C 40,65; H 2,96; N 9,48; S 7,24%, Nalezeno: C 40,46; H 3,02, N 9,09; S 6,87 %.

3,5-Dibromsalicylaldehyd-*S*-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon (2t), směs izomerů cca 1:2, výtěžek 36 %, t.t. 193–195 °C, IR (ν NH₂) 1637 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12,62 (1H, bs, OH, B), 11,97 (1H, bs, OH, A), 8,48 (1H, s, CH, A), 8,31 (1H, s, CH, B), 7,81–7,74 (2H, m, Ar, A), 7,71–7,65 (2H, m, Ar, B), 7,35–7,07 (6H, m, Ar + NH₂, A + B), 4,28 (2H, s, CH₂, B), 4,22 (2H, s, CH₂, A), 2,28 (3H, s, CH₃, B), 2,25 (3H, s, CH₃, A); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO), směs A + B δ 165,4, 161,6, 153,8, 153,7, 153,3, 150,1, 137,0, 136,5, 134,9, 134,5, 133,2, 132,6, 132,2, 129,5, 129,2, 129,2, 129,1, 122,2, 121,8, 110,8, 110,6, 110,3, 33,5, 33,2, 20,9; Anal. vyp. pro $C_{16}H_{15}Br_2N_3OS$ (457,19): C 42,03; H 3,31; N 9,19; S 7,01%, Nalezeno: C 42,17; H 3,36; N 9,30; S 6,84 %.

Antimykobakteriální aktivita

U připravených *S*-benzylisothiosemikarbazonů byla stanovena biologická aktivita proti kmenům *M. tuberculosis* (My 331/88), *M. avium* (My 330/88) a dvěma kmenům *M. kansasii* (My 235/80 a 6509/96). Jako standard pro porovnání aktivit byl použit isoniazid. Přehled sloučenin společně s hodnotami minimálních inhibičních koncentrací je v tabulce 53.

Antimykobakteriální aktivita *S*-benzylisothiosemikarbazonů se u většiny derivátů pohybuje v rozmezí 16–62,5 μ mol/l. Kvůli špatné rozpustnosti některých testovaných sloučenin v mediu se bohužel ne vždy podařilo stanovit aktivitu proti všem bakteriálním kmenům. Nejvíce aktivní salicylaldehyd-*S*-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon vykazuje ze všech připravených

sloučenin nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis* (8 µmol/l, hodnocení po 14 dnech) a je účinný i na ostatní mykobakteriální kmeny. Byl tedy doporučen pro další výzkum toxicity a vedlejších účinků.

Tabulka 53: Antimykobakteriální aktivita *S*-benzylisothiosemikarbazonů

		MIC (µmol/l)				
		Inkubační doba 14 d/21 d				
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1a	H	H	62,5/125	32/62,5	62,5/62,5	125/125
1b	H	3-Cl	32/62,5	16/62,5	62,5/62,5	62,5/62,5
1c	H	4-CH ₃	32/62,5	16/32	62,5/62,5	62,5/62,5
1d	H	4-CF ₃	32/62,5	16/62,5	62,5/62,5	32/62,5
1e	H	4-Br	16/32	16/16	62,5/62,5	32/62,5
2a	H	H	62,5n/62,5n	62,5n/125n	32n/32n	62,5n/125n
2b	H	3-Cl	32/32	62,5/125	62,5/62,5	16/32
2c	H	4-F	32/62,5n	32n/62,5n	32n/62,5n	62,5n/62,5n
2d	H	4-Cl	8/16	62,5n/125n	32/62,5	32/32n
2e	H	4-Br	16/32	62,5n/62,5n	32/32	32/32
2f	5-Cl	3-Cl	32/32	250n/250n	32/32	32/32n
2g	5-Cl	3-OCH ₃	32/32	250n/250n	32/32	62,5/62,5
2h	5-Cl	4-CH ₃	32/32	500n/500n	62,5/125n	125n/125n
2i	5-Cl	4-F	16/16	32/32n	16/32	32/32
2j	5-Cl	4-Cl	16/16	125n/250n	32/32	32/32
2k	5-Br	3-Cl	32/32	125n/125n	32/32n	125n/250n
2l	5-Br	4-CH ₃	62,5n/250n	250n/250n	125n/250n	125n/250n
2m	5-Br	4-CF ₃	32/32	32/62,5n	62,5/62,5	32/32
2n	5-Br	4-F	16/16	62,5/62,5n	32/32	32/32
2o	5-Br	4-Br	16/32	62,5n/62,5n	32n/62,5n	32/32n
2p	3,5-Cl ₂	4-CH ₃	250n/250n	250n/250n	250n/250n	250n/250n
2q	3,5-Cl ₂	4-Cl	62,5n/62,5n	125n/250n	62,5n/62,5n	62,5n/62,5n
2r	3,5-Cl ₂	4-Br	16/32	62,5n/62,5n	32/32	125n/250n
2s	3,5-Br ₂	H	250n/250n	250n/250n	125n/250n	250n/250n
2t	3,5-Br ₂	4-CH ₃	125n/250n	250n/500n	62,5n/125n	125n/250n
	INH		1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

n: nárůst (nebylo možné přesně stanovit hodnotu MIC)

Kromě aktivity proti mykobakteriím byla u vybraných derivátů vyšetřována i aktivita proti některým houbovým organismům, grampozitivním a gramnegativním bakteriím. K testování byly použity sbírkové i klinicky izolované kmeny. Z České sbírky mikroorganismů (Brno) pocházely kmeny *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Mezi kmeny klinicky izolované patřily kmeny *S. aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní, *S. epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08,

Klebsiella pneumoniae D 11750/08 a *K. pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní. Z houbových organismů byly do testů zařazeny *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445. Podmínky testování byly stejné jako u fenylesterů kyseliny salicylové (kapitola 4.2.). Žádná významnější biologická aktivita ale zjištěna nebyla.

Podíl na publikaci

Tato práce patřila k mým samostatným úkolům.

4.11. Deriváty esterů cholesterolu/terpenů a alkanových kyselin substituovaných dusíkatými bázemi

(připravováno k publikování)

Tato práce navazuje na výzkum Adamce, 2007 (137), který se zabýval syntézou a hodnocením biologické aktivity komplexních derivátů obsahujících estron připojený pomocí alkylového řetězce k různým heterocyklickým sloučeninám (pyridin, benzylsulfanylové deriváty pyridinu a deriváty tetrazol-5-thiolu). Předpokládá se, že na biologické aktivitě těchto sloučenin by se mohlo podílet více faktorů. Ve spojení s biologickou aktivitou se uvažuje o a) náboji na dusíkovém atomu, b) hydrofobní steroidní jednotce, která může interagovat s buněčnými membránami, c) délce alkylového řetězce.

Mým úkolem bylo připravit deriváty, které místo estronu obsahují cholesterol a různé terpeny. Cílem bylo zjistit, zda právě steroidní jednotka je zodpovědná za biologickou aktivitu nebo zda je možná její náhrada za jinou lipofilní jednotku.

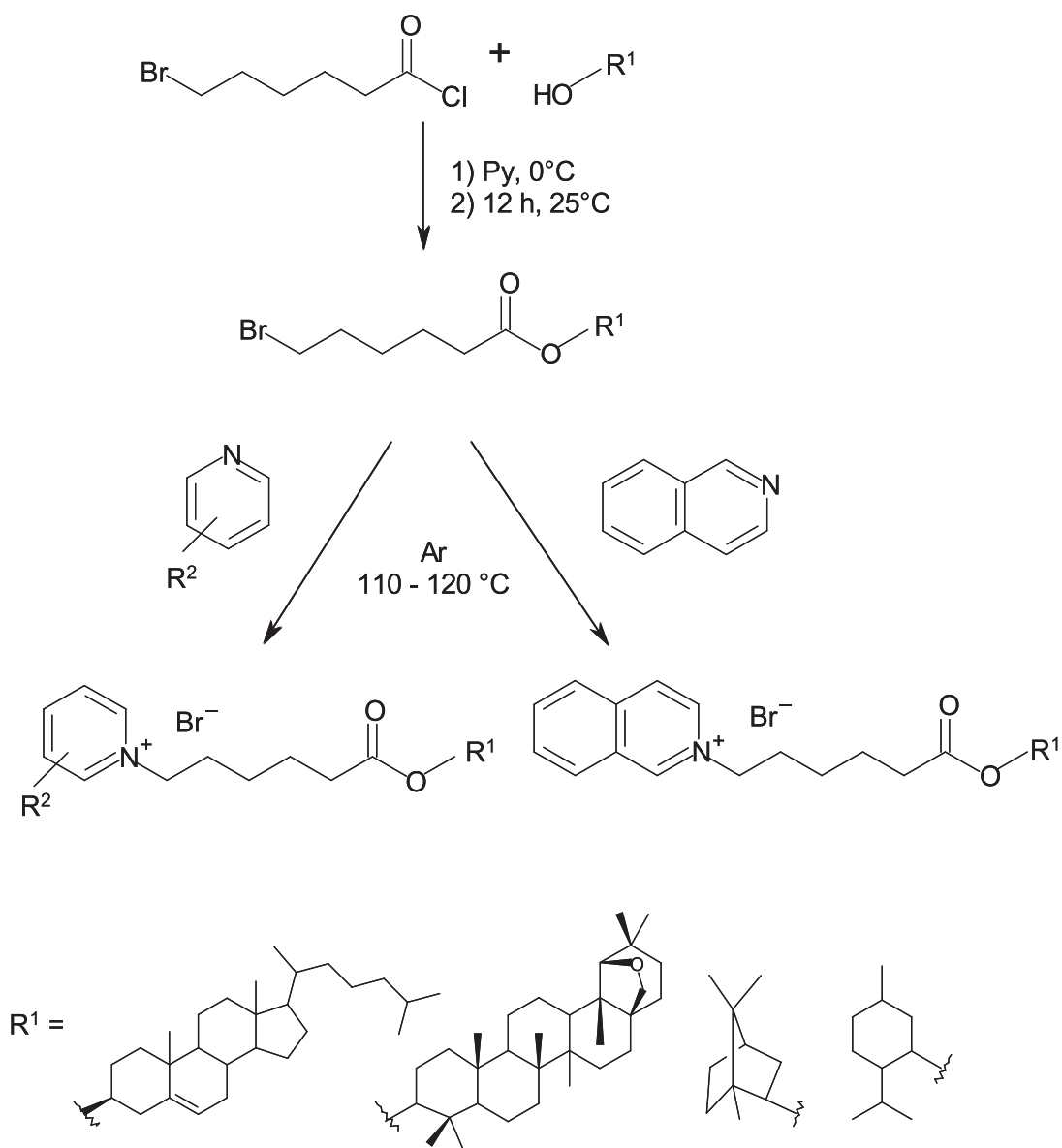
Syntéza (Obr. 101)

Příprava esterů kyseliny 6-bromhexanové

Cholesterol/terpen (0,1 mol) byl rozpuštěn v suchém pyridinu a ochlazen na 0 °C. Za stálého míchání byl po kapkách přidán 6-bromhexanoylchlorid (0,1 mol). Směs byla míchána za laboratorní teploty 36 hodin. Vzniklý produkt byl převeden do směsi 150 ml chloroformu a 150 ml 5% kyseliny chlorovodíkové. V případě cholesterolu jako výchozí sloučeniny, byl výsledný ester po odpaření chloroformu izolován a překrytalizován z acetonu. V případě terpenů vznikl výsledný ester v podobě viskózní kapaliny.

Příprava pyridinium- a isochinolinium-bromidů

Pyridinium/isochinolinium-bromidy byly připraveny reakcí esterů kyseliny 6-bromhexanové (0,1 mol) s pyridinem, 4-methylpyridinem, 3,4-dimethylpyridinem a s isochinolinem (0,3 mol). Reakce probíhala při teplotě 110 až 120 °C v atmosféře argonu. Reakce trvala přibližně 12 hodin (kontrola pomocí TLC). Po ochlazení reakční směsi byl produkt převeden do směsi 150 ml chloroformu a 150 ml 5% kyseliny chlorovodíkové. Po odpaření chloroformu byl konečný produkt izolován v podobě viskózní kapaliny.



$\text{R}^2 = \text{H}, 4\text{-CH}_3, 3,4\text{-CH}_3$

Obrázek 101: Syntéza derivátů esterů cholesterolu/terpenů a alkanových kyselin substituovaných dusíkatými bázemi

Stanovení fyzikálních vlastností připravených sloučenin

IR spektra byla změřena přístrojem NICOLET IMPACT 400. Pro NMR spektra byl použit přístroj VARIAN MERCURY VxBB 300 pracující při 300 MHz pro ^1H a při 75 MHz pro ^{13}C . Pro NMR analýzu byly sloučeniny rozpuštěny v deuteriochloroformu CDCl_3 nebo dimethylsulfoxidu DMSO.

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byly kontrolovány pomocí TLC (silikagelové desky s fluorescenčním indikátorem Silufol UV 254 + 366, Kavalier, Votice, ČR).

Připravené deriváty

1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]pyridin-1-ium-bromid (1), výtěžek 67 %, IR (ν CO_{ester}) 1731 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,43 (2H, d, J = 7,0 Hz, Ar), 8,50 (1H, t, J = 7,0 Hz, Ar), 8,12 (2H, t, J = 7,0 Hz, Ar), 5,32 (1H, d, J = 4,1 Hz, CH), 4,95 (2H, t, J = 7,3 Hz, NCH₂), 4,60–4,43 (1H, m, OCH), 2,28–0,78 (48H, m, CH + CH₂), 0,64 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172,8, 145,1, 139,5, 128,4, 122,6, 73,9, 61,5, 56,6, 56,1, 49,9, 42,2, 39,6, 39,4, 38,0, 36,9, 36,5, 36,1, 35,7, 34,0, 31,8, 31,7, 31,4, 28,1, 27,9, 27,7, 25,3, 24,2, 24,0, 23,8, 22,7, 22,5, 20,9, 19,2, 18,6, 11,8,

1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid (2), výtěžek 48 %, IR (ν CO_{ester}) 1726 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,25 (1H, s, Ar), 9,17 (1H, d, J = 6,1 Hz, Ar), 7,78 (1H, d, J = 6,1 Hz, Ar), 5,37–5,29 (1H, m, CH), 4,88 (2H, t, J = 7,3 Hz, NCH₂), 4,62–4,45 (1H, m, OCH), 2,50–0,78 (45H, m, CH + CH₂ + CH₃), 0,99 (3H, s, CH₃), 0,85 (3H, d, J = 1,4 Hz, CH₃), 0,83 (3H, d, J = 1,4 Hz, CH₃), 0,64 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 Hz, CDCl₃) δ 172,8, 157,4, 143,5, 142,0, 139,6, 138,2, 128,4, 122,6, 73,9, 60,5, 56,6, 56,1, 49,9, 42,2, 39,6, 39,4, 38,0, 36,9, 36,5, 36,1, 35,7, 33,9, 31,8, 31,8, 31,4, 28,2, 27,9, 27,7, 25,3, 24,2, 24,0, 23,8, 22,8, 22,5, 20,9, 20,3, 19,2, 18,6, 17,0, 11,8,

1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid (3), výtěžek 68 %, IR (ν CO_{ester}) 1727 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11,04 (1H, s, Ar), 8,80 (1H, d, J = 7,6 Hz, Ar), 8,72 (1H, d, J = 7,6 Hz, Ar), 8,33 (1H, d, J = 7,6 Hz, Ar), 8,15–8,03 (2H, m, Ar), 7,96–7,87 (1H, m, Ar), 5,32–5,24 (1H, m, CH), 5,09 (2H, t, J = 7,0 Hz, NCH₂), 4,59–4,43 (1H, m, OCH), 2,31–0,77 (39H, m, CH + CH₂), 0,95 (3H, s, CH₃), 0,88 (3H, d, J = 6,5 Hz, CH₃), 0,83 (3H, d, J = 6,5 Hz, CH₃), 0,64 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172,8, 150,8, 139,5, 137,1, 136,9, 134,4, 131,5, 131,2, 127,8, 126,9, 126,1, 122,5, 73,9, 61,1, 56,6, 56,0, 49,9, 42,2, 39,6, 39,4, 38,0, 36,9, 36,5, 36,1, 35,7, 33,9, 31,8, 31,7, 31,4, 28,1, 27,9, 27,6, 25,3, 24,2, 24,1, 23,7, 22,7, 22,5, 20,9, 19,2, 18,6, 11,8

2-[6-(19 β ,28-Epoxy-18 α -oleanan-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid (4), výtěžek 53 %, IR (ν CO_{ester}) 1721 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,50 (1H, bs, Ar), 8,51 (1H, bs, Ar), 8,12 (1H, bs, Ar), 5,03 (2H, bs, NCH₂), 4,42 (1H, t, J = 8,1 Hz, OCH), 3,75 (1H, d, J = 7,5 Hz, OCH₂), 3,50 (1H, s, CH), 3,42 (1H, d, J = 7,5 Hz, OCH₂), 2,59–0,63 (38H, m, CH + CH₂ + CH₃), 0,95 (6H, s, CH₃), 0,92 (3H, s, CH₃), 0,90 (3H, s, CH₃),

0,84 (3H, s, CH₃), 0,79 (3H, s, CH₃), 0,76 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173,4, 145,5, 128,7, 88,1, 81,2, 71,5, 62,0, 55,8, 51,2, 47,0, 41,7, 40,9, 40,8, 38,8, 38,1, 37,4, 36,9, 36,5, 34,3, 34,0, 32,9, 31,9, 29,9, 29,0, 28,3, 26,6, 26,5, 25,6, 24,8, 24,4, 24,0, 21,2, 20,6, 18,3, 17,3, 16,8, 16,8, 15,9, 13,7,

[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]pyridin-1-ium-bromid (5), výtěžek 64 %, IR (ν CO_{ester}) 1725 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,57 (2H, d, *J* = 7,0 Hz, Ar), 8,51 (1H, t, *J* = 7,0 Hz, Ar), 8,13 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, Ar), 5,04 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, NCH₂), 4,61 (1H, td, *J* = 10,7 Hz, *J* = 4,4 Hz, OCH), 2,26 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂), 2,16–1,99 (2H, m, CH₂), 1,94–0,92 (13H, m, CH + CH₂), 0,86 (6H, t, *J* = 6,3 Hz, CH₃), 0,69 (3H, t, *J* = 6,9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172,9, 145,3, 145,1, 128,4, 74,1, 61,6, 46,8, 40,9, 34,1, 34,0, 31,6, 31,3, 26,2, 25,3, 24,1, 23,3, 22,0, 20,7, 16,3,

[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid (6), výtěžek 51 %, IR (ν CO) 1724 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9,15 (1H, s, Ar), 9,07 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, Ar), 7,78 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, Ar), 4,80 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, NCH₂), 4,63–4,48 (1H, m, OCH), 2,55–2,38 (6H, m, CH₃), 2,21 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂), 2,06–0,87 (15H, m, CH + CH₂), 0,81 (6H, t, *J* = 6,5 Hz, CH₃), 0,64 (3H, t, *J* = 6,5 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172,9, 157,5, 143,3, 141,9, 138,2, 128,5, 74,0, 60,4, 46,7, 40,7, 34,0, 33,9, 33,7, 31,2, 26,1, 24,8, 24,0, 32,2, 21,9, 20,6, 20,2, 16,9, 16,1,

[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid (7), výtěžek 62 %, IR (ν CO_{ester}) 1724 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11,12 (1H, s, Ar), 8,86 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, Ar), 8,70 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, Ar), 8,36 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, Ar), 8,16–8,03 (2H, m, Ar), 7,89 (1H, t, *J* = 7,6 Hz, Ar), 5,27 (2H, t, *J* = 7,0 Hz, NCH₂), 4,65–4,46 (1H, m, OCH), 2,22 (2H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂), 2,17–2,03 (2H, m, CH₂), 1,93–0,71 (19H, m, CH + CH₂+CH₃), 0,62 (3H, d, *J* = 7,0 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172,8, 150,7, 137,1, 136,9, 134,4, 131,3, 131,1, 127,8, 126,9, 126,2, 74,0, 61,0, 46,7, 40,7, 33,7, 31,4, 31,2, 26,1, 25,3, 24,8, 24,1, 23,2, 21,9, 20,6, 16,1,

[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid (8), výtěžek 52 %, IR (ν CO_{ester}) 1724 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz,

CDCl₃) δ 9,19 (1H, s, Ar), 9,09 (1H, d, $J = 5,9$ Hz, Ar), 7,78 (1H, d, $J = 5,9$ Hz, Ar), 5,06–4,65 (3H, m, OCH + NCH₂), 2,60–0,95 (21H, m, CH + CH₂ + CH₃), 0,81 (3H, s, CH₃), 0,80 (3H, s, CH₃), 0,72 (3H, s, CH₃),

[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid (9), výtěžek 57 %, IR (ν CO_{ester}) 1724 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11,26 (1H, s, Ar), 8,78–8,71 (2H, m, Ar), 8,29 (1H, d, $J = 7,3$ Hz, Ar), 8,15–8,09 (2H, m, Ar), 7,99–7,90 (1H, m, Ar), 5,13 (2H, t, $J = 7,3$ Hz, NCH₂), 4,85–4,75 (1H, m, OCH), 2,38–0,94 (15H, m, CH + CH₂), 0,85 (3H, s, CH₃), 0,84 (3H, s, CH₃), 0,73 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 173,7, 151,2, 137,1, 134,1, 131,6, 131,3, 127,9, 126,9, 126,0, 79,8, 61,1, 48,6, 47,7, 44,8, 36,7, 33,9, 33,8, 31,5, 27,9, 27,0, 24,8, 19,6, 18,8, 13,5,

[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]-4-methylpyridin-1-ium-bromid (10), výtěžek 50 %, IR (ν CO_{ester}) 1719 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,06 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, Ar), 7,97 (2H, d, $J = 6,5$ Hz, Ar), 4,63–4,50 (3H, m, OCH + NCH₂), 2,56 (3H, s, CH₃), 2,32–0,89 (15H, m, CH + CH₂), 0,82 (3H, s, CH₃), 0,79 (3H, s, CH₃), 0,69 (3H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 173,3, 159,0, 144,2, 128,7, 79,9, 78,9, 59,8, 48,7, 47,7, 44,5, 40,5, 33,9, 33,6, 30,6, 27,9, 27,0, 25,7, 25,1, 24,7, 24,3, 21,7, 19,8, 18,9, 13,8,

Antimykobakteriální aktivita

Antimykobakteriální hodnocení připravených látek (Tabulka 54) bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. K hodnocení in vitro byly použity kmeny z České národní sbírky kmenových kultur (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/80 a kmen *M. kansasii* 6509/96 klinicky izolovaný. Antimykobakteriální aktivita látek byla stanovena na Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha). Testované sloučeniny byly přidávány k médiu v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 1000; 500; 250; 125; 62,5; 32; 16; 8; 4; 2 a 1 μmol·dm⁻³. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena po 14 a 21 dnech při inkubaci při 37 °C. Jako standard byl použit isoniazid (INH).

Tabulka 54: Antimykobakteriální aktivita připravených sloučenin

	MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
	Doba inkubace 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1	32/32	32n/32n	125n/125n	62,5n/62,5n
2	125/125	125n/125n	125n/125n	125n/125n
3	62,5n/125n	62,5n/125n	125n/250n	125n/125n
4	16/16	8/32	62,5/62,5	62,5/62,5
5	32/62,5	8/16	62,5/62,5	32/62,5
6	16/16	32/125	62,62,5	32/62,5
7	16/32	32/125	62,5/62,5	62,5/62,5
8	4/8	16/32	32/32	16/32
9	2/4	8/16	16/16	16/16
10	2/8	8/16	32/32	16/32
INH	1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

n: nárůst (nebylo možné přesně stanovit hodnotu MIC)

Antibakteriální aktivita

K biologickým testům byly použity jednak bakteriální kmeny pocházející z České sbírky mikroorganismů (Brno), jednak bakterie klinicky izolované (Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Hradci Králové). Ze sbírkových kmenů byla aktivita testována proti kmenům *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Klinicky izolovány byly kmeny *S. aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní, *S. epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 a *K. pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní.

K zjištění antibakteriální aktivity byla zvolena mikrodiluční bujonová metoda v destičkách. Jako kultivační médium byl použit Mueller-Hintonův bujon (Difko/Becton Dickinson, Detroit, MI). Testované sloučeniny byly přidávány k médiu v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 a 0,98 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena po 24 a 48 hodinách inkubace při 35 °C. Jako standard byly použity neomycin, penicilin G, fenoxymethylpenicilin a ciprofloxacin. Přehled antibakteriálních aktivit jednotlivých sloučenin je uveden v tabulce 55.

Antifungální aktivita

Z houbových organismů byly do testů zařazeny *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Tabulka 55: Antibakteriální aktivita

	MIC (µmol/l)													
	Doba inkubace 24 h/48 h													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	1,95/ 1,95	3,9/ 3,9	62,5/ 125	a/a	31,25/ 31,25	7,81/ 7,81	15,62/ 15,62	15,62/ 15,62	7,81/ 7,81	31,25/ 31,25	3,9/ 3,9	0,24/ 0,24	0,98/ 0,98	0,24/ 0,24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin rez.,	3,9/ 3,9	7,81/ 7,81	125/ 125	a/a	62,5/ 500	7,81/ 7,81	31,25/ 31,25	31,25/ 31,25	15,62/ 15,62	31,25/ 31,25	0,98/ 0,98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> H 6966/08	1,95/ 1,95	7,81/ 7,81	125/ 125	a/a	31,25/ 62,5	3,9/ 7,81	15,62/ 15,62	7,81/ 31,25	15,62/ 15,62	31,25/ 31,25	3,9/ 7,81	31,25/ 125	250/ 250	62,5/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	3,9/ 3,9	125/ 125	125/ 125	a/a	125/ 125	15,62/ 31,25	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	31,25/ 31,25	62,5/ 62,5	250/ 250	7,81/ 15,62	0,98/ 0,98	7,81/ 7,81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	a/a	>500/ >500	31,2/ 31,25	500/ 500	125/ 125	500/ >500	500/ 500	0,98/ 0,98	125/ 125	0,06/ 0,06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	125/ 125	62,5/ 62,5	>125/ >125	a/a	>500/ >500	62,5/ 62,5	500/ 500	500/ 500	>500/ >500	>500/ >500	0,98/ 0,98	250/ 500	0,12/ 0,12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL positivní	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	a/a	>500/ >500	125/ 125	500/ 500	500/ 500	>500/ >500	>500/ >500	0,98/ 0,98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas eruginosa</i> CCM 1961	>125/ >125	>125/ >125	>125/ >125	a/a	125/ >500	31,25/ 31,25	500/ 500	125/ 125	>500/ >500	>500/ >500	7,81/ 15,69	>500/ >500	3,9/ 7,81	>500/ >500

a: netestováno

K hodnocení antifungální aktivity byla použita mikrodiluční bujónová metoda v destičkách M27-A-M1. Jako médium bylo zvoleno RPMI 1640 médium s glutaminem (Sevapharma, Praha) upraveno na pH 7,0 pomocí 0,165M morfolinpropan-1-sulfonové kyseliny. Minimální inhibiční koncentrace MIC byla stanovena po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě, v humidní atmosféře při teplotě 35 °C. U kmene *T. mentagraphytes* byla MIC vyhodnocena po 72 a 120 hodinách. Flukonazol byl do testování zařazen jako standard pro porovnání aktivit jednotlivých derivátů. Přehled antifungální aktivity jednotlivých sloučenin je uveden v tabulce 56.

Výsledky testování

Testované sloučeniny vykazují podobnou aktivitu jako látky připravené v rámci výzkumu PharmDr. Jana Adamce, PhD. Podařilo se prokázat, že kromě estronu lze při zachování antimykobakteriální aktivity použít k přípravě sloučenin i terpeny a cholesterol. Zejména deriváty obsahující borneol jsou proti mykobakteriím výrazně aktivní.

Podíl na výzkumu

Tento výzkum patřil k mým samostatným úkolům. Na syntéze a hodnocení biologické aktivity se společně se mnou nepodílel žádný jiný student.

Tabulka 56: Antifungální aktivita

	MIC (µmol/l)										Flu
	Doba inkubace 24 h/48 h										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	15,62/ 62,5	62,6/ >125	31,25/ 125	a/a	125/ 125	7,81/ 15,62	15,62/ 31,25	31,25/ 62,5	7,81/ 15,62	31,25/ 31,25	1(±1)/ 2(±1)
<i>Candida tropicalis</i> 156	31,25/ 62,5	62,5/ 62,5	15,62/ 15,62	a/a	62,5/ 125	15,62/ 15,62	31,25/ 62,5	62,5/ 125	15,62/ 31,25	31,25/ 62,5	3(±1)/ 5(±2)
<i>Candida krusei</i> E28	15,62/ 62,5	31,25/ 62,5	>125/ >125	a/a	125/ 125	15,62/ 15,62	31,25/ 62,5	31,25/ 31,25	31,25/ 62,5	31,25/ 31,25	>50/ >50
<i>Candida glabrata</i> 20/1	15,62/ 31,25	125/ 125	15,62/ 31,25	a/a	62,5/ 125	7,81/ 31,25	31,25/ 62,5	15,62/ 125	31,25/ 31,25	7,81/ 31,25	22(±6)/ >50
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	7,81/ 31,25	125/ >125	31,25/ 31,25	a/a	125/ 250	15,62/ 31,25	62,5/ 125	62,5/ 62,5	125/ 125	31,25/ 62,5	4(±2)/ 9(±3)
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	62,5/ 125	125/ >125	125/ 125	a/a	500/ 500	62,5/ 125	250/ 250	250/ 500	125/ 125	125/ 250	>50/ >50
<i>Absidia corymbifera</i> 272	125/ >125	>125/ >125	125/ >125	a/a	>500/ >500	250/ 250	500/ 500	500/ >500	62,5/ 62,5	250/ 250	>50/ >50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445*	7,81/ 62,5	15,62/ 62,5	15,62/ 31,25	a/a	250/ 250	31,25/ 31,25	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	62,5/ 62,5	17(±6)/ 26(±1)

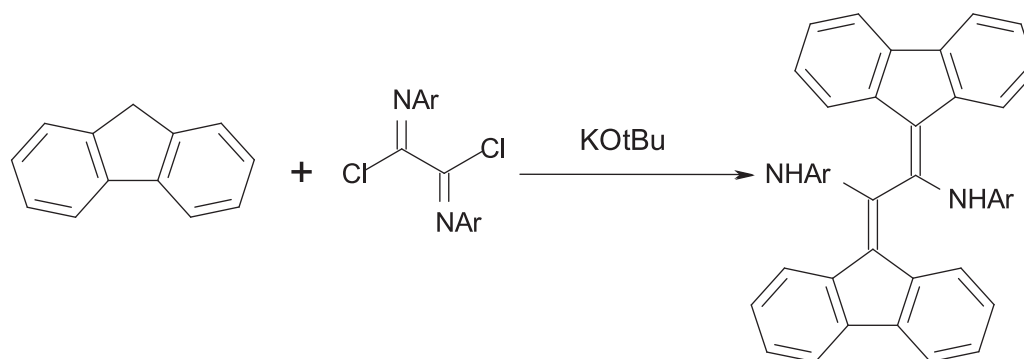
* 72 a 120 h; a: netestováno

4.12. Deriváty 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu a jejich antimykobakteriální aktivita

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUEHRDEL, G., BECKERT, R., KAUSTOVÁ: Search for New Antituberculotics. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2009, vol. 38, p. 15–18. (publikace zahrnuje informace týkající se antimykobakteriální aktivity)

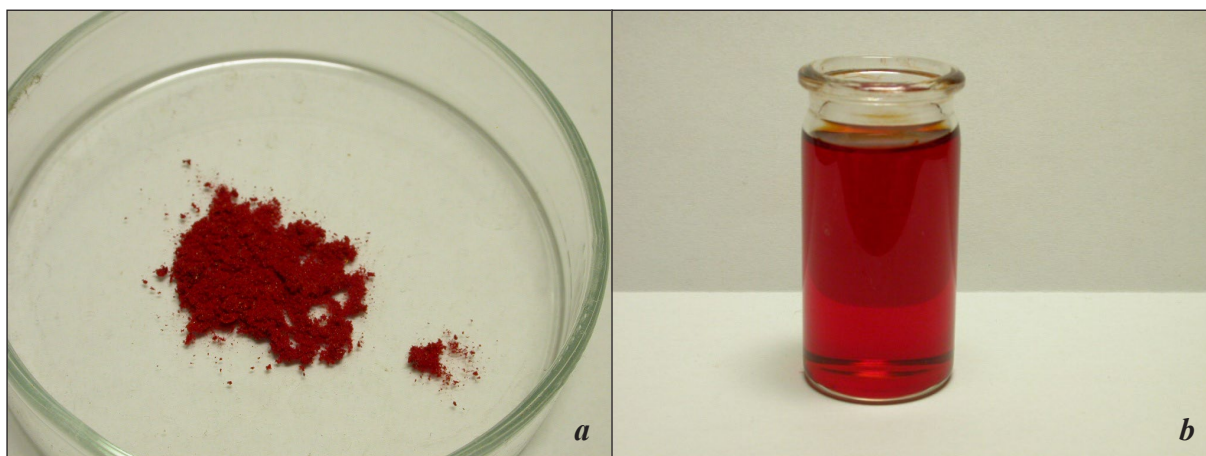
Deriváty 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu byly připraveny v rámci mého studijního pobytu na Univerzitě Friedricha Schillera v Jeně. Jedná se o sloučeniny, které ve své molekule obsahují strukturu ethan-1,2-diaminu, který je farmakoforem zodpovědným za antimykobakteriální aktivitu u ethambutolu (45). Tento farmakofor je pravděpodobně zodpovědný i za antimykobakteriální aktivitu u sloučeniny SQ 109, která vykazuje účinek proti *M. tuberculosis* i proti multirezistentním kmenům (49). Na základě těchto znalostí jsme se rozhodli prozkoumat antimykobakteriální aktivitu u nově připravených derivátů 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu.

Syntéza (Obr. 102)



Obrázek 102: Syntéza derivátů 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu

Fluoren (12 mmol) byl rozpuštěn ve 40 ml suchého THF pod atmosférou argonu. K roztoku byl přidán KOtBu (13 mmol) a reakční směs byla ochlazena na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. K ochlazené reakční směsi byl přidán bis-imidoylchlorid (6 mmol) a směs byla míchána 10 minut při pokojové teplotě. Reakční směs byla poté neutralizována pomocí HCl/isopropanolu na pH 7 a odpařena do sucha. Výsledný produkt byl krystalizován ze směsi chloroformu a *n*-heptanu. Zajímavou vlastností připravených sloučenin je fluorescence jejich chloroformových roztoků (Obr. 103).



Obrázek 103: 1,2-Bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-difenylethan-1,2-diamin v podobě pevné krystalické látky (a) a v podobě svého roztoku v chloroformu (b)

Stanovení fyzikálních vlastností připravených sloučenin

Pro NMR spektra byl použit přístroj Bruker AVANCE pracující při 250 MHz pro ^1H a při 63 MHz pro ^{13}C . Pro NMR analýzu byly sloučeniny rozpuštěny v deuteriochloroformu CDCl_3 nebo dimethylsulfoxidu DMSO.

Průběh reakce a čistota výsledných produktů byly kontrolovány pomocí TLC (Merck 60 F_{254}). Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

Připravené deriváty

1,2-Bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-bis(4-methoxyfenyl)ethan-1,2-diamin (1), $\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$ (596,74); červená krystalická látka, výtěžek 9 %, teplota tání 255 °C, ^1H NMR (250MHz, CCl_3D) δ 8,03–6,62 (m, 24H, CH-Ar), 8,93 (s, 2H, NH), 3,36 (d, 6H, OCH_3) ppm; ^{13}C -NMR (63 MHz, CCl_3D) δ 155,0 (C-Ar), 139,9–135,3(C-Ar), 126,8–119,7 (C-Ar), 114,1 (C-Ar), 55,6 (OCH_3) ppm; MS (EI) m/z: 596,4 (5) [M^+], 431,4 (5), 339,3 (5), 298,3 (98), 271,2 (30), 267,2 (30), 190,1 (10), 165,2 (100), 134,2 (50), 122,2 (12), 108,2 (5), 44,2 (3). 28,3 (10).

1,2-Bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-difenylethan-1,2-diamin (2), $\text{C}_{40}\text{H}_{28}\text{N}_2$ (536,68) červená krystalická látka, výtěžek 11 %, teplota tání 278,5 °C; ^1H NMR (250MHz, DMSO) δ 8,30–6,76 (m, 26H, CH-Ar), 10,82 (s, 2H, NH) ppm; ^{13}C NMR (63 MHz, DMSO) δ 159,1 (C-Ar), 142,3 (C-Ar), 138,5 (C-Ar), 138,1(C-Ar), 137,7(C-Ar), 129,2(CH), 128,8 (C-Ar), 125,1 (C-Ar), 121,6 (C-Ar), 118,5 (C-Ar), ppm; MS (EI) m/z: 536,4 (10) [M^+], 442,4 (8), 371,3 (10), 339,2 (10), 328,3 (10), 268,3 (100), 256,2 (10), 241,2 (8), 214,1 (5), 190 (10), 165,2 (70), 104,2 (10), 77,2 (10), 28,3 (10).

1,2-Bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-bis(naftalen-1-yl)ethan-1,2-diamin (3), C₄₈H₃₂N₂ (636,8) červená krystalická látka, výtěžek 4 %, teplota tání 259,5 °C; ¹H NMR (25 0MHz, DMSO) δ 8,31–7,30 (m, 30H, CH-Ar), 10,97 (s, 2H, NH) ppm; MS (EI) m/z: 634,4 (5) [M+], 470,4 (20), 343,3 (8), 330,3 (8), 316,3 (20), 307,3 (80), 289,2 (50), 233,2 (30), 165,1 (100), 153,1 (70), 143,2 (70), 115,2 (40), 82,6 (20), 44,2 (45).

Biologická aktivita

Antimykobakteriální hodnocení (Tabulka 57) připravených látek bylo provedeno ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě. K hodnocení in vitro byly použity kmeny z České národní sbírky kmenových kultur (CNCTC) *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88, *M. kansasii* My 235/80 a kmen *M. kansasii* 6509/96 klinicky izolovaný. Antimykobakteriální aktivita látek byla stanovena na Šulově semisyntetické půdě (SEVAC, Praha). Testované sloučeniny byly přidávány k médiu v dimethylsulfoxidu, stupnice výsledné koncentrace byla 1000; 500; 250; 125; 62,5; 32; 16; 8; 4; 2 a 1 μmol·dm⁻³. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla stanovena po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C. Jako standard byl použit isoniazid (INH).

Tabulka 57: Antimykobakteriální aktivita derivátů 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu

	MIC (μmol/l)			
	Inkubační doba 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1	16/32	125/125	62,5/62,5	62,5/125
2	32/32	125n/125n	250n/250n	62,5n/250n
3	62,5n/125n	125n/125n	250n/500n	250n/250n
INH	1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

n: nárůst (nebylo možno přesně stanovit hodnotu MIC)

Farmakoforem zodpovědným za antimykobakteriální aktivitu derivátů 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu je pravděpodobně stejně jako v případě ethambutolu ethan-1,2-diamin. Kvůli špatné rozpustnosti v médiu a tvorbě zákalů se bohužel nepodařilo stanovit biologickou aktivitu proti všem mykobakteriálním kmenům. Deriváty 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu by mohly podobně jako ethambutol a SQ109 působit na úrovni syntézy buněčné stěny mykobakterií.

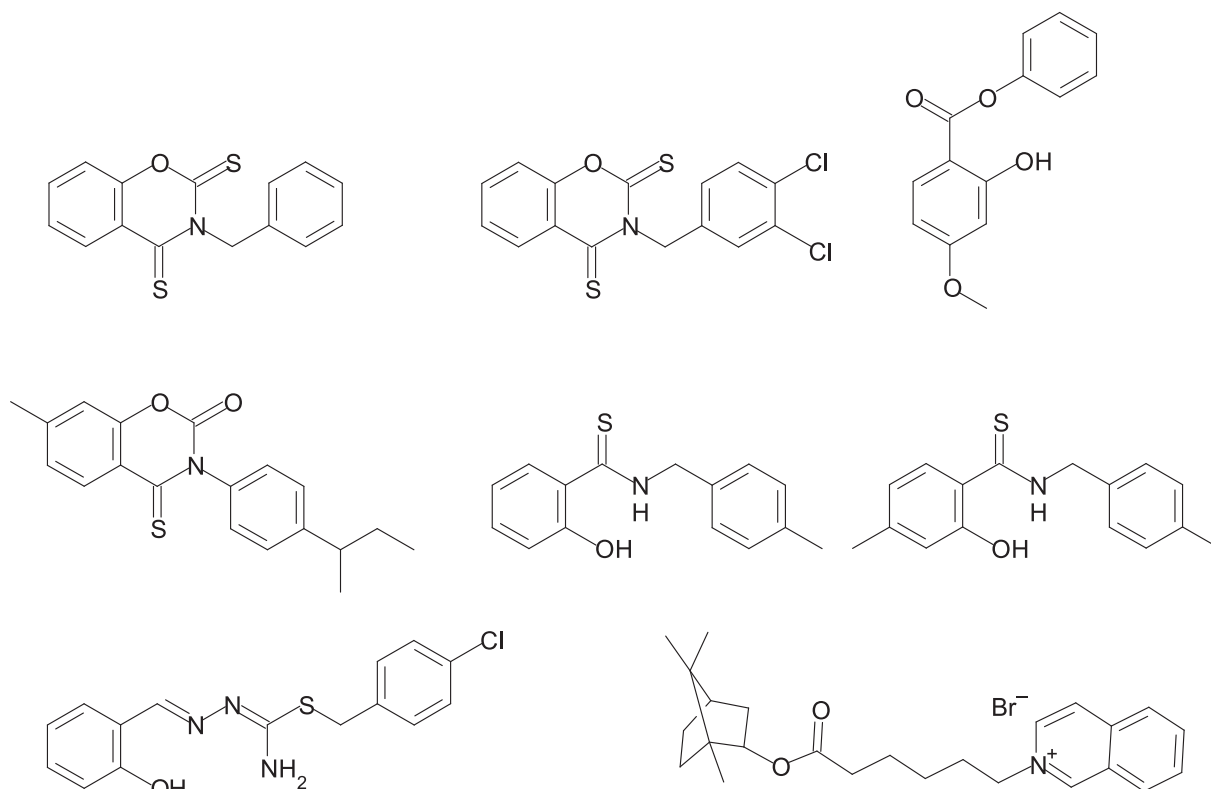
Podíl na publikaci

Tato práce byla součástí výzkumu pracovní skupiny profesora Beckerta (Univerzita Friedricha Schillera v Jeně), u něhož jsem se účastnila syntézy řady sloučenin, které však z hlediska antimykobakteriální aktivity nebyly významné a nejsou tedy součástí této disertační práce.

5. ZÁVĚR

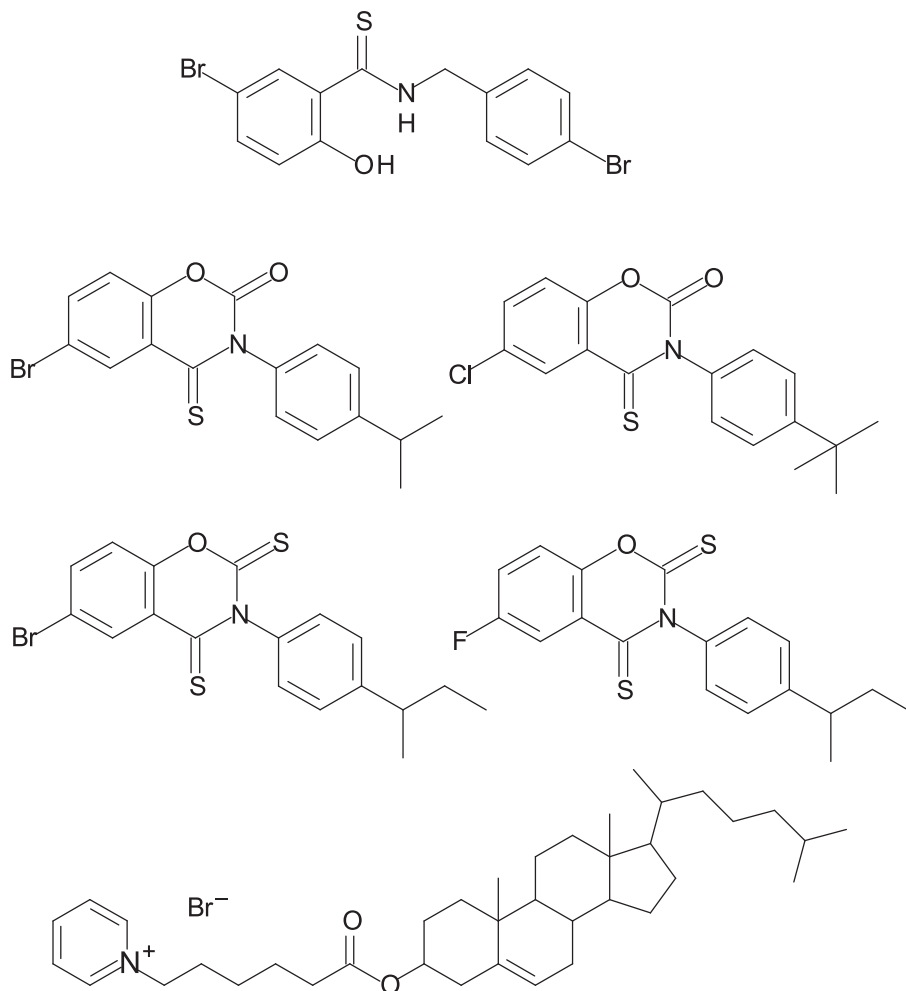
V rámci disertační práce bylo připraveno několik skupin sloučenin. Jednalo se o monosírné a disírné deriváty 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamidy, *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamidy, monosírné a disírné deriváty 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, benzaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazony, salicylaldehyd-*S*-benzylisothiosemikarbazony, deriváty 1,2-bis(9*H*-fluoren-9-yliden)-*N,N'*-diarylethan-1,2-diaminu a hybridní molekuly cholesterolu a terpenů. *N*-benzylthiosalicylamidy byly připraveny již dříve v rámci disertační práce Mgr. Doležala, PhD.

Všechny sloučeniny byly připraveny a odeslány do Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě k testování antimykobakteriální aktivity. Obrázek 104 ukazuje přehled sloučenin s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou v rámci dané skupiny sloučenin. Většina z těchto sloučenin vykazuje aktivitu srovnatelnou nebo vyšší než INH. U těchto sloučenin je plánován výzkum dalších vlastností, zejména toxicity. Aktivita *N*-(pyridylmethyl)salicylamidů byla spíše střední až nízká, proto z této skupiny sloučenin nebyl k dalšímu výzkumu vybrán žádný derivát.



Obrázek 104: Přehled antimykobakteriálně nejaktivnějších sloučenin připravených v rámci disertační práce

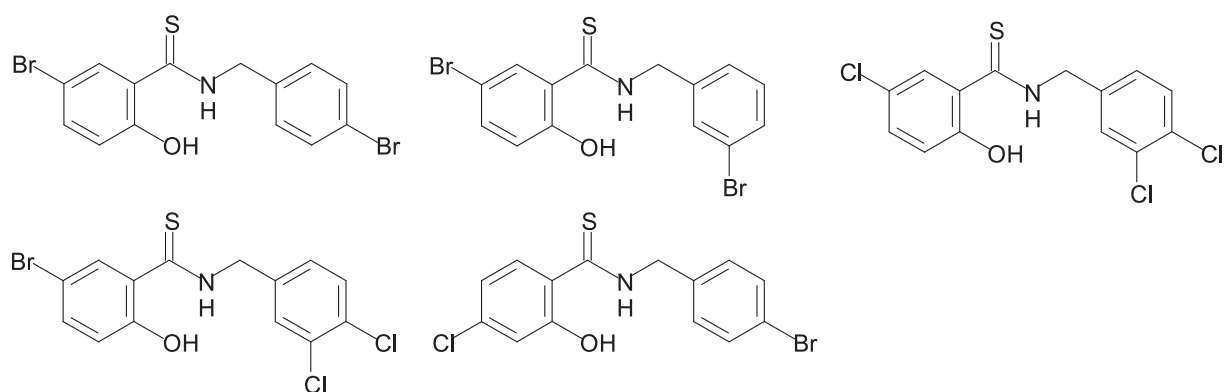
U řady sloučenin nás zajímala i antibakteriální a antifungální aktivita. Přehled nejperspektivnějších sloučenin z hlediska antibakteriální aktivity ukazuje obrázek 105. Řada sloučenin vykazuje vyšší aktivitu než běžně používaná antibiotika neomycin, ciprofloxacin, penicilin G a fenoxymethylpenicilin.



Obrázek 105: Sloučeniny s nejvyšší antibakteriální aktivitou připravené v rámci disertační práce

U *N*-benzylthiosalicylamidů byla zjištěna také významná antifungální aktivita. Antifungálně neaktivnější sloučeniny jsou na obrázku 106.

U 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů, 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů a u *N*-benzylthiosalicylamidů byla zjišťována jejich antiproliferativní aktivita a cytotoxicita. K testování antiproliferativní aktivity byly použity buňky lidské chronické myeloidní leukémie (K562) a buňky endotelové vény lidského pupečníku (HUVEC). Pro určení cytotoxicity byly použity buňky lidské rakoviny děložního hrdla (HeLa). Testované sloučeniny vykazovaly jak antiproliferativní aktivitu, tak i cytotoxicitu. U 3-(3,4-dichlorbenzyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onu, 3-(3,4-dichlorbenzyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-dithionu,



Obrázek 106: Sloučeniny s nejvyšší antifungální aktivitou připravené v rámci disertační práce

4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu a *N*-(4-methylbenzyl)thiosalicylamidu byla nalezena vysoká antimykobakteriální aktivita a zároveň hodnoty jejich IC_{50} a GI_{50} patří v rámci testovaných sloučenin ke středním. Tyto sloučeniny jsou tedy vybrány pro další testování a pro výzkum toxicity na zdravých buněčných liniích.

Jelikož je lipofilita jednou z nejvýznamnějších vlastností biologicky aktivních sloučenin byla u *N*-pyridinylmethylsalicylamidů, sírných derivátů 3-(4-alkylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, *N*-benzylthiosalicylamidů a u fenylesterů kyseliny salicylové provedena její studie na tenkých vrstvách oktdecysilanylizovaného silikagelu.

6. CITOVANÁ LITERATURA

1. WHO: 2009 update tuberculosis facts. [online], [cit. 2010-05-17]. Dostupný z WWW: http://www.who.int/tb/publications/2009/tbfactsheet_2009update_one_page.pdf
2. ÚZIS. Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky č. 38; Výskyt tuberkulózy v České republice v roce 2009. [online], [cit. 2010-07-10]. Dostupný z WWW: http://www.uzis.cz/download_file.php?file=3738
3. MENZIN, J., MEYERS, J. L., FRIEDMAN, M., PERFECT, J. R., LANGSTON, A. A., DANNA, R. P., PAPADOPOULOS, G. Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2009, vol. 66, no. 19, p.1711-1717.
4. MULVEY, M. R., SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Can. Med. Assoc. J.* 2009, vol.180, no. 4, p. 408–415.
5. WHO: Essential Drugs Monitor. 2000. [online], [cit. 2010-07-10]. Dostupný z WWW: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2248e/>
6. BÁRTŮ, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Medicína.* 2007, vol. 9, no. 9, p. 372–373.
7. WHO: 2009 update tuberculosis facts. [online], [cit. 2010-02-25]. Dostupný z WWW: http://www.who.int/tb/publications/2009/factsheet_tb_2009update_dec09.pdf.
8. VOKURKA, M., HUGO, J. *Velký lékařský slovník.* Praha : MAXDORF, 1998. ISBN 80-85800-81-0.
9. HOMOLKA, J., VOTAVA, V. *Tuberkulóza.* Praha : Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0630-5.

10. SEDLÁK, K., TOMŠÍČKOVÁ, M. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha : Scientia, 2006. ISBN 80-86960-07-2.
11. BROSCHE, R., GORDON, S. V., MARMIESSE, M., BRODIN, P., BUCHRIESER, C., EIGLMEIER, K., GARNIER, T., GUTIERREZ, C., HEWINSON, G., KREMER, K., PARSONS, L. M., PYM, A. S., SAMPER, S., SOOLINGEN VAN, D., COLE, S. T. *A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 2002, vol. 99, no. 6, p. 3684–3689.
12. ZINK, A. R., SOLA, CH., REISCHL, U., GRABNER, W., RASTOGI, N., WOLF, H., NERLICH, A. G. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from egyptian mummies by spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2003, vol. 41 no. 1, p. 359–367.
13. MOSTOWY, S., COUSINS, D., BRINKMAN J., ARANAZ, A., BEHR, M. A. Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex. *J. Infect. Dis.* 2002, vol. 186, no. 1, p. 74–80.
14. INDERLIED, C. B., KEMPER, C. A., BERMUDEZ, L. E. The Mycobacterium avium complex. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993, vol. 6, no. 3, p. 266–310.
15. *Mycobacterium tuberculosis*. In *Wikipedie : otevřená encyklopedie* [online], strana naposledy edit. 2010-01-28 [cit. 2010-05-17]. Česká verze. Dostupný z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_tuberculosis.
16. KLABAN, V. *Svět mikrobů: Ilustrovaný lexicon mikrobiologie životního prostředí*. Hradec Králové : Gaudeamus, 2001. ISBN 80-7041-687-4.
17. MADISON, B. M. Application of strains in clinical microbiology. *Biotech. Histochem.* 2001, vol. 76, no. 3, p. 119–125.
18. SILVERMAN, R. B. *The organic chemistry of drug design and drug action*. San Diego, Kalifornie, USA : Academic Press, Inc., 1992. ISBN 0-12-643730-0.

19. KUCHARŤ, M. *Výzkum a vývoj léčiv*. Praha : Vysoká škola chemicko technologická, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7.
20. FRANKLIN, T. J., SNOW, G. A. *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. New York, USA : Springer, 2005. ISBN 0-387-22554-4.
21. REMKO, M. *Základy medicínskej a farmaceutickej chémie*. Bratislava : Slovak Academic Press, 2005. ISBN 80-89104-64-9.
22. STAROBOVÁ, O., LANDA, L., NOVÁKOVÁ J., ŠULCOVÁ, A. Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity [online]. 2006 [cit. 2006-04-03]. Dostupný z WWW: <<http://portal.med.muni.cz/>>. ISSN 1801-6103.
23. COLE, S. T., BROSCHE, R., PARKHILL A KOL. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998, vol. 393, no. 11, p. 537-544.
24. MA, Y., STERN, R. J., SCHERMAN, M. S., VISSA, V. D., YAN, W., JONES, V. C., ZHANG, F., FRANZBLAU, S. G., LEWIS, W.H., MCNEIL, M. R. Drug Targeting *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Synthesis: Genetics of dTDP-Rhamnose Synthetic Enzymes and Development of Microtiter Plate-Based Screen for Inhibitors of Conversion of dTDP-Glucose to dTDP-Rhamnose. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, vol. 45, no. 5, p. 1407–1416.
25. ELAMIN, A. A, STEHR, M., OEHLMANN, W., SINGH, M. The Mycolyltransferase 85A, a putative drug target of *Mycobacterium tuberculosis*: Development of a novel assay and quantification of glycolipid status of the mycobacterial cell wall. *J. Microbiol. Methods*. 2009, vol. 79, no. 3, p. 358–363.
26. SCHROEDER, E. K., SOUZA, O. N., SANTOS, D. S., BLANCHARD, J. S., BASSO, L. A. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002, vol. 3, no. 3, p. 197–225.

27. WOLUCKA, B. A., MCNEIL, M. R., HOFFMAN, DE E., CHOJNACKI, T., BRENNAN, P. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 1994, vol. 269, no. 37, p. 23328–23335.
28. CHATTERJEE, D., KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effect. *Glycobiology*. 1998, vol. 8, no. 2, p. 113–120.
29. CRICK, D. C., MAHAPATRA, S., BRENNAN, P. J. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology*. 2001, vol. 11, no. 9, p. 107R–118R.
30. 30. HEMMING, F. W. Lipids in glycan synthesis. *Biochemistry*. 1974, vol. 1, no. 4, p. 39–97.
31. CRICK, D. C., SCHULBAH, M. C., ZINK, E. E., MACCHIA, M., BARONTINI, S., BESRA, G. S., BRENNAN, P. J. Polyprenyl phosphate biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis. *J. Bacteriol.* 2000, vol. 182, no. 20, p. 5771–5778.
32. DUVOLD, T., BRAVO, J. M., PALE-GROSDEMANGE, C., ROHMER, M. Biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol, a putative C-5 intermediate in the mevalonate independent pathway for isoprenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* 1997, vol. 38, p. 4769–4772.
33. BAILEY, A. M., MAHAPATRA, S., BRENNAN, P. J., CRICK, D. C. Purification and characterization of 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase from Mycobacterium tuberculosis. *Glycobiology*. 2000, vol. 10, p. 46.
34. RILLING, H. C. The mechanism of the condensation reactions of cholesterol biosynthesis. Fourth Morton lecture. *Biochem. Soc. Trans.* 1985, vol. 13, no. 6, p. 997–1003.

35. SCHULBACH, M. C., MAHAPATRA, S., MACCHIA, M., BARONTINI, S., PAPI, C., MINUTOLO, F., BERTINI, S., BRENNAN, P. J., CRICK, D. C. Purification, enzymatic characterization, and inhibition of the Z-farnesyl diphosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2001, vol. 274, p. 11624–11630.
36. SCHULBAH, M. C., BRENNAN, P. J., CRICK, D. C. Identification of a short (C15) chain Z-isoprenyl diphosphate synthase and homologous long (C50) chain isoprenyl diphosphate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2000, vol. 275, no. 30, p. 22876–22881.
37. TAKAYMA, K., SCHNOES, H. K., SEMMLER, E. J. Characterization of the alkali-stable mannophospholipids of *Mycobacterium smegmatis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973, vol. 316, no. 2, p. 212–221.
38. KAPRÁLEK, F. *Základy bakteriologie*. Praha : Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-811-5.
39. MAHAPATRA, S., CRICK, D. C., BRENNAN, P. J. Comparison of the UDP-N-acetylmuramate: L-alanine ligase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* 2000, vol. 182, p. 6827–6830.
40. BREUKINK, E., HEUSDEN VAN, H. E., VOLLMERHAUS, P. J., SWIEZEWSKA, E., BRUNNER, L., WALKER, S., HECK, A. J. R., KRUIJFF, B. Lipid II an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, no. 22, p. 19898–19903.
41. MCNEIL, M., DAFFÉ, M., BRENNAN, P. J. Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J. Biol. Chem.* 1990, vol. 265, no. 30, p. 18200–18206.
42. DAFFÉ, M., BRENNAN, P. J., MCNEIL, M. Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectroscopy and by ¹H and ¹³C NMR analyses. *J. Biol. Chem.* 1990, vol. 265, no. 12, p. 6734–6743.

43. BESRA, G. S., KHOO, K. H., McNEIL, M. R., DELL, A., MORRIS, H. R., BRENNAN, P. J. A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. 1995, vol. 34, no. 13, p. 4257–4266.
44. BERG, S., KAUR, D., JACKSON, M., BRENNAN, P. J. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology*. 2007, vol. 17, no. 6, p. 35R–56R.
45. SREEVATSAN, S., STOCKBAUER, K. E., PAN, X., KREISWIRTH, B. N., MOGHAZEH, S. L., JACOBS, W. R., TELENTI, A., MUSSER, J. M. Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Critical role of embB mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, vol. 41, no. 8, p. 1677–1681.
46. BELANGER, A. E., BESRA, G. S., FORD, M. E., MIKUSOVA, K., BELISLE, J. T., BRENNAN, P. J., INAMINE, J. M. The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for antimycobacterial drug ethambutol. *Microbiology*. 1996, vol. 93, no. 21, p. 11919–11924.
47. BALLELL, L., FIELD, R. A., DUNCAN, K., YOUNG, R. J. New small-molecule synthetic antimycobacterials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, vol. 49, no. 6, p. 2153–2163.
48. JANIN, Y. L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, vol. 15, no. 7, p. 2479–2513.
49. PROTOPOPOVA, M., HANRAHAN, C., NIKONENKO, B., SAMALA, R., CHEN, P., GEARHART, J., EINCK, L., NACY, C. A. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, vol. 56, no. 5, p. 968–974.

50. MENG, Q., LUO, H., LIU, Y., LI, W., ZHANG, W., YAO, Q. Synthesis and evaluation of carbamate prodrugs of SQ109 as antituberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, vol. 19, no. 10, p. 2808–2810.
51. BOOGARD VAN DEN, J., KIBIKI, G. S., KISANGA, E. R., BOEREE, M. J., AARNOUTSE, R. E. New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, vol. 53, no. 3, p. 849–862.
52. MAKAROV, V. a kol. Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis. *Science.* 2009, vol. 324, no. 5928, p. 801–804.
53. MINNIKIN, D. E. Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. *The biology of the Mycobacteria.* 1982, p. 95–184.
54. TAKAYMA, K., WANG, C., BESRA G. S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, vol. 18, no. 1, p. 81–101.
55. MINNIKIN, D. E., POLGAR, N. Structural studies on the mycolic acids. *Chem. Commun.* 1967, p. 312–314.
56. BHOWRUTH, V., ALDERWICK, L. J., BROWN, A. K., BHATT, A., BESRA, G. S. Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochem. Soc. Trans.* 2008, vol. 36, p. 555–565.
57. KREMER, L., NAMPOOTHIRI, K. M., LESJEAN, S., DOVER, L. G., GRAHAM, S., BETTS, J., BRENNAN, P. J., MINNIKIN, D. E., LOCHT, C., BESRA, G. S. Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), Two major components of Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* 2001, vol. 276, no. 30, p. 27967–27974.

58. SCHWEITZER, E., HOFMANN, J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): Major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Molecul. Biol. R.* 2004, vol. 68, no. 3, p. 501–517.
59. ROZWARSKI, D. A., GRANT, G. A., BARTON, D. H. R., JACOBS, W. R., SACHETTINI, J. C. modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1998, vol. 279, no. 2, p. 98–102.
60. DUCASSE-CABANOT, S., COHEN-GONSAUD, M., MARRAKCHI, H., NGUYEN, M., ZERBIB, D., BERNADOU, J., DAFFÉ, M., LABESSE, G., QUÉMARD, A. In vitro inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA by isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, vol. 48, no. 1, p. 242–249.
61. WANG, F., LANGLEY, R., GULTEN, G., DOVER, L. G., BESRA, G. S., JACOBS, W. R., SACHETTINI, J. C. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J. Exp. Med.* 2007, vol. 204, no. 1, p. 73–78.
62. ALAHARI, A., TRIVELLI, X., GUÉRARDEL, Y., DOVER, L. G., BESRA, G. S., SACCHETTINI, J. C., REYNOLDS, R. C., COXON, G. D., KREMER, L. Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in *Mycobacteria*. *PlosOne*. 2007, vol. 2, no. 12, p. 1343.
63. KINI, S. G., BHAT, A. R., BRYANT, B., WILLIAMSON, J. S., DAYAN, F. E. Synthesis, antitubercular activity and docking study of novel cyclic azole substituted diphenyl ether derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, vol. 44, no. 2, p. 492–500.
64. PHETSUKSIRI, B., JAKCKSON, M., SCHERMAN, H., MCNEIL, M., BESRA, G. S., BAULARD, A. R., SLAYDEN, R. A., DEBARBER, A. E., BARRY, C. E., BAIRD, M. S., CRICK, D. C., BRENNAN, P. J. Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 2003, vol. 278, no. 52, p. 53123–53130.

65. SINGH, R., MANJUNTHA, U., BOSHOFF, H. I. M., HA, Y. H., IYOMRATTANAKIT, P., LEDWINGE, R., DOWD, C. S., LEE, I. Y., KIM, P., ZHANG, L., KANG, S., KELLER, T. H., JIRICEK, J., BARRY, C. E. PA-824 Kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science*. 2008, vol. 322, no. 5906, p. 1392–1395.
66. TRIVEDI, O. A., ARORA, P., VATS, A., ANSARI, M. Z., TICKOO, R., SRIDHARAN, V., MOHANTY, D., GOKHALE, R. S. Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Molecular Cell*. 2005, vol. 17, no. 5, p. 631–643.
67. PARISH, T., BROWN, A. *Mycobacterium, Genomics and Molecular Biology*. Norfolk, UK : Caister Academic Press, 2009. ISBN 978-1-904455-40-0.
68. HOTTER, G. S., WARDS, B. J., MOUAT, P., BESRA, G. S., GOMES, J., SINGH, M., BASSETT, S., KAWAKAMI, P., WHEELER, P. R., LISLE, G. W., COLLINS, D. M. Transposon mutagenesis of Mb0100 at the *ppe1-nrp* locus in *Mycobacterium bovis* disrupts phthiocerol dimycocerosate (PDIM) and glycosylphenol-PDIM biosynthesis, producing an avirulent strain with vaccine properties at least equal to those of *M. bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 2005, vol. 187, no. 7, p. 2267–2277.
69. BHATT, K., GURCHA, S. S., BHATT, A., BESRA, G. S., JACOBS, W. R. Two polyketide-synthase-associated acyltransferases are required for sulfolipid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2007, vol. 153, p. 513–520.
70. RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Cell Biol.* 2001, vol. 2, no. 8, p. 569–577.
71. VOSS DE, J. J., RUTTER, K., SCHROEDER, B. G., BARRY, C. E. Iron acquisition and metabolism by *Mycobacteria*. *J. Bacteriol.* 1999, vol. 181, no. 15, p. 4443–4451.
72. VOSS DE, J. J., RUTTER, K., SCHROEDER, B. G., SU, H., ZHU, Y., BARRY, C. E. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth of macrophages. *PNAS*. 2000, vol. 97, no. 3, p. 1252–1257.

73. FERRERAS, J. A., RYU, J. S., LELLO DI, F., TAN, D. S., QUADRI, L. E. N. Small-molecule inhibition of siderophore biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Nat. Chem. Biol.* 2005, vol. 1, no. 1, p. 29–32.
74. GRANDONI, J. A., MARTA, P. T., SCHLOSS, J. V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, vol. 42, p. 475–482.
75. SOHN, H., LEE, K. S., KO, Y. K., RYU, J. W., WOO, J. CH., KOO, D. W., SHIN, S. J., AHN, S. J., SHIN, A. R., SONG, CH. H., JO, E. K., PARK, J. K, KIM, H. J. In vitro and ex vivo activity of new derivatives of acetohydroxyacid synthase inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 2008, vol. 31, no. 6, p. 567–571.
76. HONG, J. A., BHAVE, D. P., CARROLL, K. S. Identification of critical ligand binding determinants in *Mycobacterium tuberculosis* adenosin-5'-phosphosulfate reductase. *J. Med. Chem.* 2009, vol. 52, no. 17, p. 5485–5495.
77. COSCONATI, S., HONG, J. A., NOVELLINO, E., CARROLL, K. S., GOODSSELL, D. S., OLSON, A. J. Structure-based virtual screening and biological evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* adenosine-5'-phosphosulfate reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2008, vol. 51, no. 21, p. 6627–6630.
78. ANDRIES, K., VERHASSELT, P., GUILLEMONT, J., GOEHLMANN, H. W. H., NEEFS, J-M., WINKLER, H., GESTEL, J. V., TIMMERMAN, P., ZHU, M., LEE, E., WILLIAMS, P., CHAFFOY, DE D., HUITRIC, E., HOFFNER, S., CAMBAU, E., TRUFFOT-PERNOT, CH., LOUNIS, N., JARLIER, V. A Diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2005, vol. 307, no. 223, p. 223–227.

79. AMAREL, L., KRISTIENSEN, J. E., VIVEIROS, M., ATOUGUIA, J. Activity of phenothiazines against antibiotic resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of tioridazine as anti-tuberculosis therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, vol. 45, p. 505–511.
80. STEPHENSON, K., HOCH, J. A. Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms. *Curr. Med. Chem.* 2004, vol. 11, no. 6, p. 765–773.
81. MACELA, A., STULÍK, J., TREBICHAVSKÝ, I., KROČA, M., JANOVSÁ, S. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Praha : Grada, 2006. ISBN 80-247-0664-4.
82. HETT, E. C., RUBIN, E. J. Bacteria growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2008, vol. 72, no. 1, p. 126–156.
83. WAISSER, K. *Bioorganická chemie*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-547-7.
84. SULING, W. J., REYNOLDS, R. C., BARROW, E. W., WILSON, L. N., PIPER, J. R., BARROW, W. W. Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex to lipophilic deazapteridine derivatives, inhibitors of dihydrofolate reductase. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998, vol. 42, p. 811–815.
85. HARTL, J. a kol. *Farmaceutická chemie IV*. Praha : Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1169-3.
86. PATOLE, J., SHINGNAPURKAR, D., PADHYE, S., RATLEDGE, C. Schiff Base Conjugates of p-aminosalicylic acid as antimycobacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, vol. 16, no. 6, p. 1514–1517.
87. SULING, W. J., MADDRY, J. Antimycobacterial activity of 1-deaza-7,8-dihydropteridine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, vol. 47, p. 451–454.

88. HIRIYANNA, K. T., ROMAKRISHNAN, T. Deoxyribonucleic acid replication time in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Arch. Microbiol.* 1986, vol. 144, no. 2, p. 105–109.
89. DOBIÁŠ, L., DOBIÁŠOVÁ, S., SEMAN, M. *Obecná a speciální mikrobiologie*. Ostrava: MULTEX Soft. s.r.o, 2003.
90. ROZSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie*. Brno, 2006. ISBN 80-902562-5-2.
91. ATLAS, R. M. *Principles of Microbiology*. USA : Mosby, 1994. ISBN 0-8016-7790-4.
92. GenomeNet, Kyoto University Bioinformatics Center. [online], [cit. 2010-05-23]. Dostupný z WWW: www.genome.jp/kegg/pathway/mtu/mtu03030.html.
93. HEINZL, S. Neue Antibiotika. *Chemotherapie Journal*. 2006, vol. 2, p. 40–44.
94. BOER DE, P., CROSSLEY, R., ROTHFIELD, L. The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature*. 1992, vol. 359, no. 6392, p. 254–256.
95. GOEHRING, N. W., BECKWITH, J. Diverse paths to midcel: Assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* 2005, vol. 15, no 13, p. R514-R526.
96. WHITE, E. L., SULING, W. J., ROSS, L. J., SEITZ, L. E., REYNOLDS, R. C. 2-Alkoxy-carbonylaminopyridines: inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, vol. 50, p. 111–114.
97. CAMPBELL, E. A., KORZHEVA, N., MUSTAEV, A., MURAKAMI, K., NAIR, S., GOLDFARB, A., DARST, S. A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. 2001, vol.104, no. 6, p. 901–912.
98. KLEMENS, S. P., CYNAMON, M. H. In vivo activities of newer rifamycin analogs against *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, vol. 35, no. 10, p. 2026–2030.

99. CLEMENTS, J. M., BECKETT, R. P., BROWN, A., CATLIN, G., LOBELL, M., PALAN, S., THOMAS, W., WHITTAKER, M., WOOD, S., SALAMA, S., BAKER, P. J., RODGERS, H. F., BARYNIN, V., RICE, D. W., HUNTER, M. G. Antibiotic activity and characterization of BB-3497, a novel peptide deformylase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, vol. 45, no. 5, p. 563–570.
100. KENNEY, T. J., CHURCHWARD, G. Genetic analysis of the *Mycobacterium smegmatis* rpsL promoter. *J. Bacteriol.* 1996, vol. 178, no. 12, 3564–3571.
101. FALZARI, K., ZHU, Z., PAN, D., LIU, H., HONGMANEE, P. FRANZBLAU, S. G. In vitro and in vivo activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, vol. 49, no. 4, p. 1447–1454.
102. FORTÚN, J., MARTÍN- DÁVILA, P., NAVAS, E., PÉREZ-ELÍAS, M. J., COBO, J., TATO, M., PEDROSA, E. G-G., GOMÉZ-MAMPASO, E., MORENO, S. Linezolid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, vol. 56, p. 180–185.
103. POULSEN, S. M., KARLSSON, M., JOHANSSON, L. B., VESTER, B. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Mol. Microbiol.* 2001, vol. 41, no. 5, p. 1091–1099.
104. PUCCI, M. J., BRONSON, J. J., BARRETT, J. F., DENBLEYKER, K. L., DISCOTTO, L. F., FUNG-TOMC, J. C., UEDA, Y. Antimicrobial evaluation of nocathiacins, a thiazole peptide class of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, vol. 48, no. 10, p. 3697–3701.
105. ATTWOOD, M. M. An investigation into the mode of action of actinonin. *J. Gen. Microbiol.* 1969, vol. 55, p. 209–216.

106. TEO, J. W. P., THAYLAN, P., BEER, D., YAP, A. S. L., NANJUNDAPPA, M., NQEW, X., DURAISWAMY, J., LIUNG, S., DARTOIS, V., SCHREIBER, M., HASAN, S., CYNAMON, M., RYDER, N. S., YANG, X., WEIDMANN, B., BRACKEN, K., DICK, T., MUKHERJEE, K. Peptide deformylase inhibitors as potent antimycobacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, vol. 50, no. 11, p. 3665–3673.
107. HURDLE, J. G., O'NEILL, A. J., CHOPRA, I. Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, vol. 49, no. 12, p. 4821–4833.
108. MCLEAN, K. J., MARSHALL, K. R., RICHMOND, A., HUNTER, I. S., FOWLER, K., KIESER, T., GURCHA, S. S., BESRA, G. S., MUNRO, A. W. Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology.* 2002, vol. 148, p. 2937–2949.
109. MCLEAN, K. J., CARROLL, P., LEWIS, D. G., DUNFORD, A. J., SEWARD, H. J., NEELI, R., CHEESMAN, M. R., MARSOLLIER, L., DOUGLAS, P., SMITH, W. E., ROSENKRANDS, I., COLE, S. T., LEYS, D., PARISH, T., MUNRO, A. W. Characterization of active site structure in CYP121. *J. Biol. Chem.* 2008, vol. 283, no. 48, p. 3406–33416.
110. MUNRO, A. W., MCLEAN, K. J., MARSHALL, K. R., WARMAN, A. J., LEWIS, G., ROITEL, O., SUTCLIFFE, M. J., KEMP, C. A., MODI, S., SCRUTTON, N. S., LEYS, D. Cytochromes P450: novel drug targets in the war against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Soc. Trans.* 2003, vol. 33, p. 625–630.
111. OULLET, H., PODUST, L. M., ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Mycobacterial CYP130. *J. Biol. Chem.* 2008, vol. 283, no. 8, p. 5069–5080.
112. MCLEAN, K. J., LAFITE, P., LEVY, C., CHEESMAN, M. R., MAST, N., PIKULEVA, I. A., LEYS, D., MUNRO, A. W. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125. *J. Biol. Chem.* 2009, vol. 284, no. 21, p. 35524–35533.

113. BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 2005, vol. 22, p. 162–195.
114. PEŘINA, M. *Antimykobakteriální N-benzylsalicylamidy a jim odpovídající 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony*. Hradec Králové 2003. Disertační práce (PhD.), Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
115. *Organic Syntheses*. 1963, vol. 4, p. 178–179.
116. TETKO, I. V., GASTEIGER, J., TODESCHINI, R., MAURI, A., LIVINGSTONE, D., ERTL, P., PALYULIN, V. A., RADCHENKO, E. V., ZEFIROV, N. S., MAKARENKO, A. S. TANCHUK, V. Y., PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory-design and description. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 2005, vol. 19, 453–463.
117. VCCLAB. Virtual Computational Chemistry Laboratory. [online]. Dostupný z WWW: <http://www.vcclab.org>.2005.
118. WAISSER, K., PEŘINA, M., KLIMEŠOVÁ, V., KAUSTOVÁ, J. On the relationship between the structure and antimykobacterial activity of substituted *N*-benzylsalicylamides. *Collect. Czech Commun.* 2003, vol. 68, no.7, p. 1275–1294.
119. KUBICOVÁ L., WAISSER, K. Biologická aktivita salicylanilidů. *ČeskSlov. Farm.* 1992, vol. 16, no. 6, p. 208–216.
120. MACIELANG, M. J., DEMERS, J. P., FRAGA-SPANO, S. A., HLASTA, D. J., JOHNSON, S. G., KONOJIA, R. M., RUSSEL, R. K., SUI, Z., WEIDNER-WELLS, M. A., WERBLOOD, H., FOLENO, B. D., GOLSCHMIDT, R. M., LOELOGG, M. J., WEBB, G. C., BARRETT, J. F. Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.* 1998, vol. 41, no. 16, p. 2939–2945.

121. HLASTA, D. J., DEMERS, J. P., FOLENO, B. D., FRAGA-SPANO, S. A., GUAN, J., HILLIARD, J. J., MACIELAG, M. J., OHEMENG, K. A., SHEPPARD, C. M., SUI, Z., WEBB, G. C., WEIDNER-WELLS, M. A., WERBLOOD, H., BARRETT, J. F. Novel inhibitors of bacterial two-component systems with gram positive antibacterial activity: pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, vol. 8, no. 14, p. 1923–1928.
122. KAUPI, A. M., NORDFELTH, R., HAGGLUND, U., WOLF-WATZ, H., ELOFSSON, M. Salicylanilide are potent inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, vol. 529, p. 97–100.
123. WAISSER, K., MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KUNEŠ, J., KLIMEŠOVÁ, V., KAUSTOVÁ, J., MOELLMANN, U., DAHSE, HM., MIKO, M. The oriented development of antituberculotics: Salicylanilides. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2006, vol. 339, no. 11, p. 616–620.
124. TERADA, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* 1990, vol. 87, p. 213–218.
125. WHITEHOUSE, M. W. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs-III. uncoupling of oxidative phosphorylation in a connective tissue (cartilage) and liver mitochondria by salicylate analogues: Relationship of structure to activity. *Biochem. Pharmacol.* 1964, vol. 13, no. 3, p. 319–336.
126. HUSÁKOVÁ, P. *Nové skupiny potenciálních antituberkulotik s thioxo skupinou*. Hradec Králové 2008. Rigorózní práce (RNDr.). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
127. DIVIŠOVÁ, H. *Vývoj nové skupiny potenciálních antituberkulotik*. Hradec Králové 2007. Rigorózní práce (RNDr.). Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

128. HOLÝ, P. *Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v poloze 5 substituovaných salicylanilidů a jim odpovídajících 3-aryl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů a jejich sirných derivátů*. Hradec Králové 2001. Disertační práce (PhD.), Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
129. WAISSER, K., HLADŮVKOVÁ, J., HOLÝ, P., MACHÁČEK, M., KARAJANNIS, P., KUBICOVÁ, L., KLIMEŠOVÁ, V., KUNEŠ, J., KAUSTOVÁ, J. *Chem. Pap.* 2001, vol. 55, p. 323.
130. KUBICOVÁ, L., ŠUSTR, M., MACHÁČEK, M., WAISSER, K., BUCHTA, V., KUBANOVÁ, P., KAUSTOVÁ, J., KRÁLOVÁ, K. *International Electronic Conferences on Synthetic Organic Chemistry*. 2004, 304.
131. WAISSER, K., MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KUNEŠ, J., KLIMEŠOVÁ, V., PALÁT, K., KAUSTOVÁ, J. The oriented development of antituberculotics (Part II): halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-diones. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007, vol. 340, no. 5, p. 264–267.
132. WAISSER, K., MATYK, J., KUNEŠ, J., DOLEŽAL, R., KAUSTOVÁ, J., DAHSE, H.M. Highly active potential antituberculotics: 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones substituted in ring-B by halogen. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2008, vol. 341, p. 800–803.
133. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., HEINISCH, L., ŠLOSÁREK, M., JANOTA, J. New antimycobacterial S-alkylisothiosemicarbazones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2007, vol. 35-36, p. 37–39.
134. WAISSER, K., HEINISCH, L., ŠLOSÁREK, M., JANOTA, J. New Antimycobacterial S-Alkylisothiosemicarbazones. *Folia Microbiol.* 2005, vol. 50, no. 6, p. 479–481.
135. HEINISCH, L., TONEW, M., TONEW, E. Synthese und antivirale Wirkung N-heterocyclischer Formylisothiosemicarbazone. *Pharmazie*. 1977, vol. 32, p. 752–755.

136. KLIMEŠOVÁ, V., KOČÍ, J., ZAHAJSKÝ, I. Advances in the development of new antimycobacterial agents. The alkylsulfanyl group - the pharmacophore of antimycobacterial activity. *ČeskSlov. Farm.* 2002, vol. 51, p. 26–36.
137. ADAMEC J., BECKERT, R., WEISS, D., KLIMEŠOVÁ, V., WAISSER, K., MOELMANN, U., KAUSTOVÁ, J., BUCHTA, V. Hybrid molecules of estrone: New compounds with potential antibacterial, antifungal, and antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, vol. 15, no. 8, p. 2898–2906.

7. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Publikace související s disertační prací

1. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., KLIMEŠOVÁ, V., KUNEŠ, J., PALÁT, K., KAUSTOVÁ, J., DAHSE HM., MÖLLMANN, U.: A Note to the Biological Activity of Benzoxazine Derivatives Containing the Thioxo Group. *Eur. J. Med.Chem.* 2010, vol. 45, no. 7, p. 2719–2725.
2. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., PALÁT, K., KUNEŠ, J., KAUSTOVÁ, J.: New Group of Potential Antituberculotics: *N*-(2-Pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-Pyridylmethyl)salicylamides. *Chem. Pap.*, under review.
3. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., VRABCOVÁ, P., KOLÁŘ, K., STOLAŘÍKOVÁ J.: The Antimycobacterial Salicylanilides, Inhibitors of ATP Synthesis. *Folia Pharm. Univ. Carol.* accepted.
4. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., VRABCOVÁ, P., KUNEŠ, J., KOLÁŘ, K. STOLAŘÍKOVÁ, J.: Highly Active Antimycobacterial Derivatives of Benzoxazine. *Bioorg. Med. Chem.*, under review.
5. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K.: TLC Study of the Lipophilicity of New Antibacterial Active Benzoxazine Derivatives Containing a Thioxo Group. *J. Planar. Chromatography*, under review.
6. DOLEŽAL, R., WAISSER K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., KUBICOVÁ, L., MACHÁČEK, M., KAUSTOVÁ, J., DAHSE, H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics, *Arch. Pharm. Life Sci.* 2009, vol. 342, no. 2, p. 113–119.
7. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUCHTA, V., JÍLEK, P., VEJSOVÁ, M.: *N*-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with Promising Antimycotic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, p. 4535–4538.

8. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., DUFKOVÁ, I.: Antibacterial Activity of *N*-Benzylsalicylthioamides, *Folia Microbiol.* 2010, in press.
9. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., STOLAŘÍKOVÁ, J.: New *S*-Benzylisothiosemicarbazones with Antimycobacterial Activity. *Folia Microbiol.*, under review.
10. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUEHRDEL, G., BECKERT, R., KAUSTOVÁ, J.: Search for New Antituberculotics. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2009, vol. 38, p.15–18.

Ostatní publikace

1. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E.: Review on Antimycobacterial Thiobenzamides and Thiobenzanilides. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2009, vol. 38, p 35–41.
2. WAISSER, K., ČIŽMÁRIK, J., HOLÝ, P., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., KAUSTOVÁ, J.: Antimycobacterial 3-(Ethoxythiocarbonylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-Ethoxythiocarbonylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones. *Acta Facult. Pharm. Univ. Comaniae*, 2009, vol. 56.
3. BUEHRDEL, G., PETRLÍKOVÁ, E., HERZIGOVÁ, P., BECKERT, R., GOERLS, H.: Synthesis of New Lipophilic Sulfones and their Use in Cyclization Reactions, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* 2009, vol. 184. no. 5, p. 1161–1174.
4. BUEHRDEL, G., BECKERT, R., HERZIGOVÁ, P., PETRLÍKOVÁ, E., SCHUCH, D., BIRCKNER, E., GOERLS, H.: A New Synthesis of Push-Pull Pyrroles, Their Oxidation to Stable 3*H*-Pyrroles and an Unexpected Anellation Reaction, *Eur. J. Org. Chem.* 2009, p. 3404–3412.
5. BUEHRDEL, G., BECKERT, R., PETRLÍKOVÁ, E., HERZIGOVÁ, P., KLIMEŠOVÁ, V.: A New Synthesis of Bis-Enaminones via Acylation of Ketones, *Synthesis-Stuttgart* 2008, vol. 19, p. 3071–3080.
6. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., HEINISCH, L., ŠLOSÁREK, M., JANOTA, J.: New Antimycobacterial *S*-Alkylisothiosemicarbazones, *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2007, vol. 35, no. 36, p. 37–40.
7. TŮMA, J., PETRLÍKOVÁ, E., KNEDLÍKOVÁ, D.: Obsah dusičnanů v zelenině, *Biologie, chemie, zeměpis*, 2006, p. 244–248.

Příspěvky na symposiích

1. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., BUCHTA, V., DUFKOVÁ, I., KAUSTOVÁ, J.: *N*-Benzylsalicylthioamidy: Sloučeniny s antifungálním a antibakteriálním účinkem, *Chemické listy* 2010, roč. 104, č. 6, s. 437. 62. sjezd chemických společností, Pardubice, červen 2010 (poster).
2. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., STOLAŘÍKOVÁ, J.: *Nové isothiosemikarbazony jako potenciální antituberkulotika*, *Chemické listy* 2009, roč. 103, č. 11, s. 979. 44. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, listopad 2009 (poster).
3. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KAUSTOVÁ, J.: Deriváty *N*-(4-Alkylphenyl)salicylamidů jako potenciální antituberkulotika, *Sborník*, s. 130. 38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, září 2009 (poster)
4. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KAUSTOVÁ, J.: Potenciální antituberkulotika obsahující thiokarbonyl, *Sborník*, s. 58. 38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, září 2009 (přednáška)
5. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DUFKOVÁ, I., VEJSOVÁ, M., KAUSTOVÁ, J., STOLAŘÍKOVÁ J.: Nová potenciální léčiva na bázi kvartérních amoniových solí, *ChemZi* 2009, roč. 9, vol. 5, s. 183-184. 61. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, Slovensko, září 2009 (poster)
6. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KAUSTOVÁ, J.: Nová potenciální antituberkulotika s thioxoskupinou, *Chemické listy* 2008, roč. 102, č. 11, s. 1063-1064. 43. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, listopad 2008 (poster).
7. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P.: Nová potenciální antituberkulotika obsahující thioxo skupinu, *Sborník*, s. 26. Konference DSP studentů ve Farmacii, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, říjen 2008 (přednáška) .

8. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., KAUSTOVÁ, J.: Hledání antituberkulotik o novém mechanismu účinku. *Chemické listy* 2008, roč. 102, č. 14, s. 240. 37. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, září 2008 (poster).

9. PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., WAISSER, K., KAUSTOVÁ, J.: 3-Benzyl-4-thio-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony a 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-dithiony, Sborník 36. konference Syntéza a analýza léčiv, Bratislava, Slovensko, září 2007 (poster).

8. PŘÍLOHY

1. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., KLIMEŠOVÁ, V., KUNEŠ, J., PALÁT, K., KAUSTOVÁ, J., DAHSE HM., MÖLLMANN, U.: A Note to the Biological Activity of Benzoxazine Derivatives Containing the Thioxo Group. *Eur. J. Med.Chem.* 2010, vol. 45, no. 7, p. 2719–2725.
2. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., PALÁT, K., KUNEŠ, J., KAUSTOVÁ, J.: New Group of Potential Antituberculotics: *N*-(2-Pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-Pyridylmethyl)salicylamides. *Chem. Pap.*, under review.
3. WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., VRABCOVÁ, P., KOLÁŘ, K., STOLAŘÍKOVÁ J.: The Antimycobacterial Salicylanilides, Inhibitors of ATP Synthesis. *Folia Pharm. Univ. Carol.* accepted.
4. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., VRABCOVÁ, P., KUNEŠ, J., KOLÁŘ, K. STOLAŘÍKOVÁ, J.: Highly Active Antimycobacterial Derivatives of Benzoxazine. *Bioorg. Med. Chem.*, under review.
5. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K.: TLC Study of the Lipophilicity of New Antibacterial Active Benzoxazine Derivatives Containing a Thioxo Group. *J. Planar. Chromatography.*, under review.
6. DOLEŽAL, R., WAISSER K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J., KUBICOVÁ, L., MACHÁČEK, M., KAUSTOVÁ, J., DAHSE, H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics, *Arch. Pharm. Life Sci.* 2009, vol. 342, no. 2, p. 113–119.
7. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUCHTA, V., JÍLEK, P., VEJSOVÁ, M.: *N*-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with Promising Antimycotic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, p. 4535–4538.

8. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., DUFKOVÁ, I.: Antibacterial Activity of *N*-Benzylsalicylthioamides, *Folia Microbiol.* 2010, in press.
9. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L., STOLAŘÍKOVÁ, J.: New *S*-Benzylisothiosemicarbazones with Antimycobacterial Activity. *Folia Microbiol.*, under review.
10. PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUEHRDEL, G., BECKERT, R., KAUSTOVÁ, J.: Search for New Antituberculotics. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2009, vol. 38, p.15–18.
11. Seznam sloučenin připravených v průběhu studia

WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., PEŘINA, M., KLIMEŠOVÁ, V., KUNEŠ, J., PALÁT, K., KAUSTOVÁ, J., DAHSE H. M., MÖLLMANN, U.: A Note to the Biological Activity of Benzoxazine Derivatives Containing the Thioxo Group. *Eur. J. Med.Chem.* 2010, vol. 45, no. 7, p. 2719–2725.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

A note to the biological activity of benzoxazine derivatives containing the thioxo group

Karel Waisser^{a,*}, Eva Petrlíková^a, Milan Peřina^a, Věra Klimešová^a, Jiří Kuneš^a, Karel Palát Jr.^a, Jarmila Kaustová^b, Hans-Martin Dahse^c, Ute Möllmann^c^a Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovský-Str. 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic^b Department for Diagnostics of Mycobacteria, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Partyzánské náměstí 7, 70200 Ostrava, Czech Republic^c Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, Beutenbergstr. 11a, D-07745 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2008

Received in revised form

12 February 2010

Accepted 15 February 2010

Available online 20 February 2010

Keywords:

Benzoxazine

Thioxo group

Antimycobacterial activity

Cytotoxicity

Antiproliferative activity

ABSTRACT

New 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were synthesized. The compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium avium*. The replacement of the carbonyl group by the thiocarbonyl group increased the antimycobacterial activity. The most active derivatives were more active than isonicotinhydrazide (INH). The cytotoxicity and the antiproliferative activity were studied as well.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

In the period dating from 1985 there has been an increase in the occurrence of tuberculosis in both Europe and North America. In the developing countries, due to the insufficient medical care and hygienic standards, a number of mycobacterial strains become resistant to antituberculous drugs used (i.e. multidrug resistant strains). Due to the contemporary migration of the population with this infection, it is often transferred to Europe and North America. The multidrug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* are brought to Central Europe mainly from the countries of the former Soviet Union. In addition, this unfavorable state is also being influenced by an increase in the occurrence of AIDS which is often accompanied by mycobacterial diseases. Our aim is the development of drugs that show the activity against *M. tuberculosis* and against the potential pathogenic strains of mycobacterium (*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium kansasii*). The purpose of our research is the development of new antituberculous agents with high activity. We have recently studied some hybrid molecules of estrone [1], many isosters of salicylanilides and salicylamides [2,3] and some derivatives of

benzylsulfanyl benzoxazole [4]. We suppose that the mechanism of their antimycobacterial action is different from the mechanisms of recent commercial drugs [5,6]. The most active compounds show better activity than INH. The goal is to study the antimycobacterial activity of some compounds with the thioxo group, i.e. substituted 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones prepared from *N*-benzylsalicylamides. The compounds in this study are the derivatives of benzoxazinediones in which one or both oxo groups were replaced by the thioxo group. We focused both on their cytotoxicity and antiproliferative activity. Many antituberculous agents containing the thioxo group were important in the history of antituberculous, e.g. *p*-acetamidobenzaldehyde thiosemicarbazone (Thiacetazone) [7], 4, 4'-bis(isopentoxy)thiocarbonyl (Isoxyl) [8] and 2-ethylpyridine-4-carboxamide (Ethionamide) [9]. The replacement of the oxo group by the thioxo group generally increases antimycobacterial activity. The compounds with the thioxo group are usually the inhibitors of mycolic acid biosynthesis [8,9]. Our study comes out from a previous QSAR calculation [10].

2. Chemistry

The synthesis of starting 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones has already been described [11]. Initially we studied the

* Corresponding author. Tel.: +420 495067276; fax: +420 465067166.
E-mail address: waisser@faf.cuni.cz (K. Waisser).

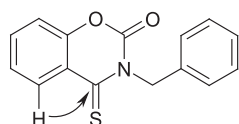
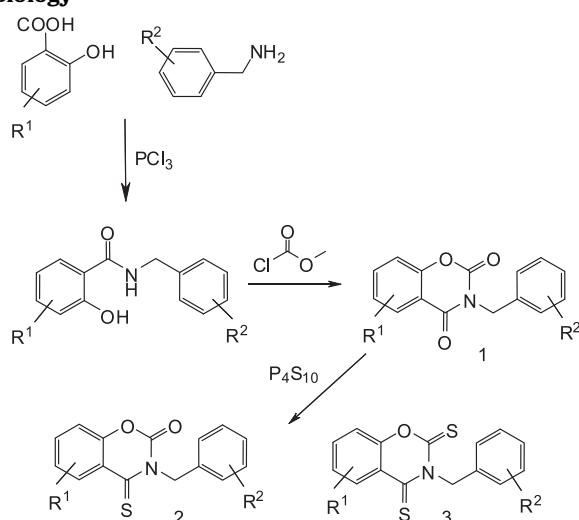


Fig. 1. 2D NMR: a correlation between the hydrogen in position 5 and the thiocarbonyl group.

conditions of the synthesis of 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. The compounds prepared by the reaction of 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones with P_4S_{10} form a chromatographic swimmingly separable mixture of sulfur analogues. These products differ in their colour, 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones crystallise as yellow or orange solids, while 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones form red coloured crystals. The fractions of pure compounds were collected and crystallized from ethanol. The mother liquor was evaporated. The residue contained the pure compound (controlled by TLC). Additionally we crystallized the residue from ethanol. Two methods were developed for the conversion of the oxo group to the thioxo group in 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. The conditions of the first method (A) were very mild (lower temperature, an equivalent amount of the reagents and a shorter time of reaction). 3-Benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones were the main products. The position of sulfur was established by 2D NMR. The position of the thiocarbonyl group was determined via gHMQC correlation of hydrogen in position 5 with the carbon atom of the thiocarbonyl group in position 4 over three bonds. A cross-peak of the hydrogen in position 5 and the thiocarbonyl group is displayed in Fig. 1.

An increase in the reagents, temperature and reaction time was used in the method (B). The reaction yielded a mixture of both products. The synthetic pathway is illustrated in Scheme 1. The first two steps have already been published [11,12].

3. Biology



Scheme 1. Synthesis of 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. a Ref [12], b Ref. [11]. Substituents are described in Table 1.

3-Benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones, 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones and corresponding 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones were used for the biological evaluations. The *in vitro* antimycobacterial activity of these compounds was evaluated against *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 (identical with

H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (identical with ATCC 12 478, resistant to INH), *M. avium* CNCTC My 330/88 (identical with ATCC 25291, resistant to INH) and *M. kansasii* 6509/96 using the dilution-micromethod for the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC). All these strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague, with the exception of *M. kansasii* 6509/96. This strain was clinically isolated, because of the fact that INH-resistant strains of *M. kansasii* have not been found in the Czech Republic.

All prepared compounds were also tested for their cytotoxicity (cell death) and antiproliferative activity (retardation of cell proliferation). HeLa (ATCC CRL-1730, human cervical cancer cells) were used for the cytotoxic assay, while HUVEC (ATCC CRL-1730, human umbilical vein endothelial cells) and K-562 (DSM ACC 10, human immortalised myelogenous leukaemia cells) served for the evaluation of antiproliferative activity. For these studies, we used different colorimetric assays to determine the number of viable cells. Under our experimental conditions, the optical density measured from the CellTiter-Blue[®] reagent and methylene blue assay is proportional to the number of viable cells.

4. Results and discussion

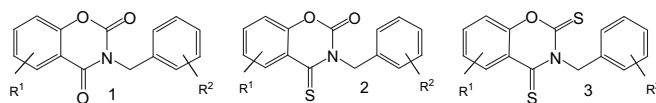
We prepared two groups of benzoxazine derivatives with the thioxo group: 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones (**2a–2i**) and 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones (**3a–3i**). The mixture of these sulfur analogues was obtained by the reaction of previously prepared 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones (**1a–1i**) with phosphorus pentasulfide. We used two different methods for this preparation. The first method (A) was mild, the reaction temperature was 180–190 °C, the equivalent molecular amount of the reagent was used and the melting time was 20 min. The increase in temperature, the duration of the reaction and the excess of phosphorus pentasulfide (P_4S_{10}) provided both products, increasing the yield (method B). The temperature of the reaction was 200–210 °C, a three times larger amount of phosphorus pentasulfide was used and the duration of melting was 40 min. The products were separated by column chromatography. Only 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones were obtained by method A in some cases (**2e–2i**). The frequencies in the region (1735–1758 cm^{-1}) within the infrared spectra are characteristic of 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones. The second method resulted in the production of both products. The location of sulfur for 3-benzyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones was elaborated by gHMQC experiments.

The correlation of the chemical shifts of the carbon in the thiocarbonyl moiety with the chemical shifts of H-5 was observed (see Fig. 1). The structure of 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones was also confirmed by NMR. The modifications of molecules were made by various substituents.

In vitro antimycobacterial activity of the compounds against *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 330/88 and *M. kansasii* 6509/96 are summarized in Table 1. To compare the MIC (minimum inhibition concentration) values, the previously described 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones (**1a–1i**) [9] were inserted in Table 1. Thus the replacement of the oxo group by the thioxo group increases the antimycobacterial activity. All studied compounds are active against INH-resistant strains *M. kansasii* CNCTC My 235/80 and *M. avium* CNCTC My 330/88. The antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* of compounds **2d**, **2e**, **2g** and **3a** is comparable with the activity of INH but the activity against *M. kansasii* 6509/96 is higher. All strains are active to rifampicin but the activity

Table 1

Minimum inhibitory activity of 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.



Compounds			MIC ($\mu\text{mol/L}$) Incubation time 14 d/21 d			
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
1a	H	H	32/32	32/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
1b	6-Br	H	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/125	62.5/125
1c	6-Cl	H	62.5/125	32/62.5	32/62.5	125/125
1d	6-CH ₃	H	32/62.5	32/62.5	62.5/62.5	62.5/125
1e	6-Cl	4-F	32/32	32/32	62.5/62.5	a/125
1f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	62.5/125	125/125	125/125	125/125
1g	H	3,4-Cl ₂	32/32	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5
1h	6-Br	3,4-Cl ₂	32/32	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5
1i	6-Cl	3,4-Cl ₂	16/16	16/32	62.5/62.5	62.5/62.5
2a	H	H	1/2	8/8	4/8	4/8
2b	6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
2c	6-Cl	H	1/2	4/8	8/8	4/4
2d	6-CH ₃	H	1/1	2/2	1/2	1/2
2e	6-Cl	4-F	1/1	4/4	4/8	4/4
2f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	2/2	4/4	16/16	16/16
2g	H	3,4-Cl ₂	1/1	1/1	2/4	2/4
2h	6-Br	3,4-Cl ₂	2/4	8/8	16/16	16/16
2i	6-Cl	3,4-Cl ₂	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
3a	H	H	1/1	1/1	2/2	1/2
3b	6-Br	H	1/2	8/8	8/8	4/8
3c	6-Cl	H	n	n	n	n
3d	6-CH ₃	H	n	n	n	n
3e	6-Cl	4-F	1/2	8/16	8/16	8/16
3f	6,8-Cl ₂	3,4-Cl ₂	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
3g	H	3,4-Cl ₂	1/2	0.5/0.5	4/4	4/4
3h	6-Br	3,4-Cl ₂	4/8	16/16	16/32	16/32
3i	6-Cl	3,4-Cl ₂	4/8	16/32	32/32	32/32
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8
Rifampicin			0.25/0.5	16/65	0.25/0.25	0.125/0.25

Antimycobacterial activity of 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones was taken over from the Ref. [11]. n, The test was not evaluated due to the low solubility of the compound.

of rifampicin against *M. avium* CNCTC My 330/88 is low. Thus, rifampicin has no medical importance in this case.

Above all, the compounds in the study possess excellent antimycobacterial activity. It was also necessary to study their side effects, cytotoxicity and antiproliferative activity. The results are shown in Figs. 2–4.

The antimycobacterial activities of sulfur analogs of 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, especially 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, are strong, but due to their cytotoxicity they seemed not to be prospective as antituberculous drugs.

5. Experimental protocols

5.1. Chemistry, general information

The melting points were determined on a Kofler apparatus. The samples for the analyses and antimycobacterial tests were dried over P₂O₅ at 61 °C and 66 Pa for 24 h. Elemental analyses (C, H, N) were performed on a CHNS-O CE elemental analyzer (Fisons EA 1110, Milan) and were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. The IR spectra were measured in KBr pellets on a Nicolet Impact 400 apparatus; the wavenumbers are given in cm⁻¹. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator Silufol UV 254 + 366 (Kavalier Votice, Czech Republic), hexane–acetone (3:1) was used as

the mobile phase. Crystallization of products was carried out from ethanol. The ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of new compounds were recorded in CDCl₃ or DMSO-*d*₆ solutions at ambient temperature on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H NMR, and 75 MHz for ¹³C NMR. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (2.49 for ¹H or 39.7 for ¹³C). The position of the thiocarbonyl group was determined via gHMQC correlation of hydrogen in position 5 with the carbon atom of the thiocarbonyl group in position 4 over three bonds. The starting 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones were prepared in our previous paper [11] (see Scheme 1).

5.1.1. Chemistry, synthetic procedures for the preparation of 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones

A) 3-Benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones prepared in the previous paper [10] (3.8 mmol) were melted with P₄S₁₀ (3.8 mmol) for 20 min (180–190 °C). After cooling to the room temperature, a 10% potassium carbonate solution (60 mL) was poured into the reaction mixture; the crude product was filtered off, and dissolved in toluene (p.a., 40 mL). Column chromatography on silica gel gave 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones (**2a–2d**) and 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones (**3a–3i**).

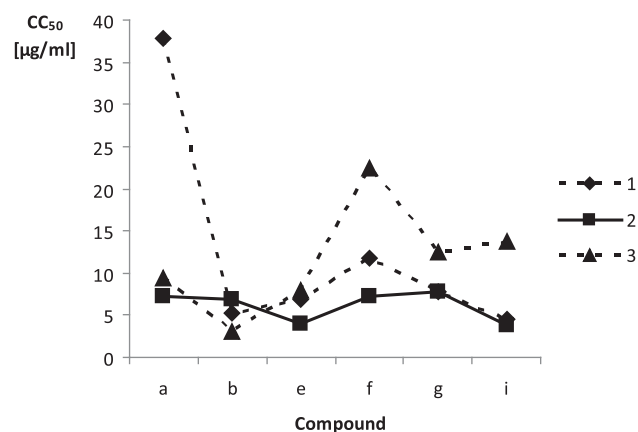


Fig. 2. Cytotoxicity (HeLa): 1) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, 2) 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 3) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

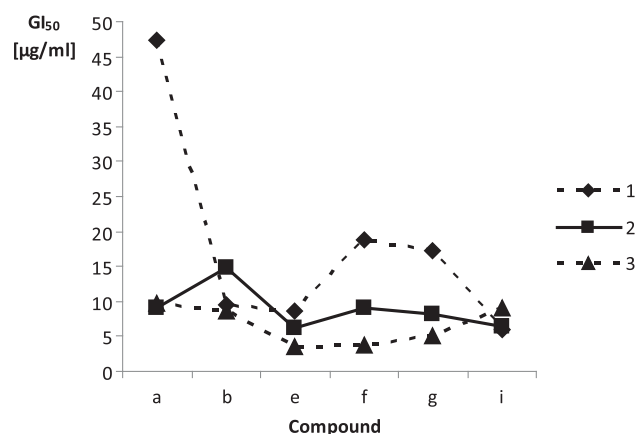


Fig. 4. Antiproliferative activity (HUVEC): 1) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, 2) 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 3) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

(3*H*)-dithiones (**3a–3d**). In other cases only 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones (**2e–2i**) were isolated.

B) 3-Benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones prepared in the previous paper [10] (3.8 mmol) were melted with of P₄S₁₀ (10.1 mmol) for 40 min (200–210 °C). After cooling to the room temperature, a 10% potassium carbonate solution (60 mL) was poured into the reaction mixture; the crude product was filtered off, and dissolved in toluene (p.a., at the most 40 mL). Column chromatography on silica gel gave 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones (**2e–2i**) and 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones (**3e–3i**).

5.1.2. 3-Benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2a**)

3-Benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2a**) was synthesized using procedure A from 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (0.96 g, 3.8 mmol) to yield 20% (0.204 g, 0.758 mmol) of the title compound as a crystalline yellow solid. Mp. 115–116 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1735 cm⁻¹.

For C₁₅H₁₁NO₂S (269.3 g/mol) calculated: 66.91% C, 5.20% N, 4.09% H, 11.90% S; found: 66.77% C, 5.15% N, 4.14% H, 11.68% S.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.7 Hz, H5), 7.86–7.80 (m, 1H, H7), 7.45–7.41 (m, 2H, H6, H8), 7.37–7.21 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 5.66 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 91.7, 149.6, 145.3, 136.6, 135.4, 131.7, 128.5, 127.4, 127.3, 125.9, 120.5, 116.7, 51.7.

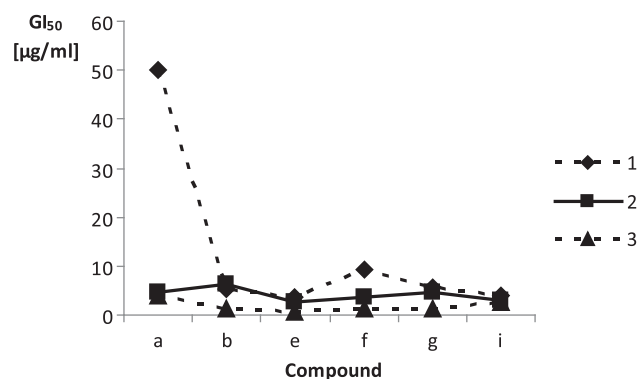


Fig. 3. Antiproliferative activity (K-562): 1) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, 2) 3-benzyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 3) 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

5.1.3. 3-Benzyl-6-bromo-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2b**)

3-Benzyl-6-bromo-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2b**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-bromo-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1.26 g, 3.8 mmol) to yield 21% (0.277 g, 0.796 mmol) of the title compound as a crystalline yellow solid. Mp. 130–133 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1758 cm⁻¹.

For C₁₅H₁₀BrNO₂S (348.2) calculated: 51.72% C, 4.02% N, 2.87% H, 9.20% S; found: 51.64% C, 3.97% N, 2.94% H, 9.06% S.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H5), 7.98 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.4 Hz, H7), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H8), 7.37–7.23 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 5.64 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.2, 148.8, 144.9, 138.7, 135.1, 133.1, 128.4, 127.4, 127.3, 122.1, 119.4, 117.6, 52.0.

5.1.4. 3-Benzyl-6-chloro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2c**)

3-Benzyl-6-chloro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2c**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-chloro-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1.09 g, 3.8 mmol) to yield 26% (0.3 g, 0.988 mmol) of the title compound as a crystalline yellow solid. Mp. 120–122 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1762 cm⁻¹.

For C₁₅H₁₀ClNO₂S (303.8) calculated: 59.31% C, 4.61% N, 3.29% H, 10.54% S; found: 59.49% C, 4.57% N, 3.34% H, 10.45% S.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H5), 7.88 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.7 Hz, H7), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H8), 7.38–7.21 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 5.64 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.3, 148.4, 144.9, 135.9, 135.1, 130.1, 129.9, 128.5, 127.4, 127.3, 121.7, 119.2, 52.0.

5.1.5. 3-Benzyl-6-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2d**)

3-Benzyl-6-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2d**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-methyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1.02 g, 3.8 mmol) to yield 22% (0.25 g, 0.872 mmol) of the title compound as a crystalline yellow solid. Mp. 132–135 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1746 cm⁻¹.

For C₁₆H₁₃NO₂S (283.4) calculated: 67.82% C, 4.62% H, 4.94% N, 11.32% S; found: 67.51% C, 4.61% H, 4.90% N, 11.00% S.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H5), 7.63 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.1 Hz, H7), 7.35–7.20 (m, 6H, H8, H2', H3', H4', H5', H6'), 5.66 (s, 2H, CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 191.7, 147.7, 145.4, 137.4, 135.4, 131.2, 128.5, 127.4, 127.3, 120.1, 116.6, 51.6, 20.5.

5.1.6. 6-Chloro-3-(4-fluorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2e**)

6-Chloro-3-(4-fluorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2e**) was prepared using procedure A from 6-chloro-3-(4-fluorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.16 g, 3.8 mmol) to yield 24% (0.29 g, 0.911 mmol) of the title compound and using procedure B to yield 34% (0.42 g, 1.290 mmol) of a crystalline yellow solid. Mp. 127–129 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1751 cm^{-1} .

For $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClFNO}_2\text{S}$ (321.8) calculated: 55.99% C, 2.82% H, 4.35% N, 9.94% S; found: 55.94% C, 4.26% N, 2.91% H, 9.92% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.19 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H5), 7.87 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.4$ Hz, H7), 7.49 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H8), 7.46–7.40 (m, AA', BB', 2H, H2', H6), 7.16–7.08 (m, AA', BB', 2H, H3', H5'), 5.60 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 190.3, 161.6 (d, $J = 241.6$ Hz), 148.4, 145.0, 135.9, 131.3 (d, $J = 3.1$ Hz), 129.9 (d, $J = 18.8$ Hz), 129.8, 129.7, 121.8, 119.2, 115.4 (d, $J = 21.1$ Hz), 51.4.

5.1.7. 6,8-Dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2f**)

6,8-Dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2f**) was prepared using procedure A from 6,8-dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.49 g, 3.8 mmol) to yield 24% (0.37 g, 0.911 mmol) of the title compound and using procedure B to yield 34% (0.53 g, 1.292 mmol) of a crystalline yellow solid. Mp. 169–170 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1739 cm^{-1} .

For $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{Cl}_4\text{NO}_2\text{S}$ (407.1) calculated: 44.26% C, 1.73% H, 3.44% N, 7.88% S; found: 44.03% C, 1.83% H, 3.52% N, 7.72% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.23 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H5), 8.15 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H7), 7.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H2'), 7.57 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H5'), 7.40 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H6'), 5.58 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 189.6, 145.2, 144.5, 136.1, 135.0, 131.2, 130.5, 129.9, 129.4, 129.1, 129.1, 127.8, 122.9, 121.8, 51.6.

5.1.8. 3-(3,4-Dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2g**)

3-(3,4-Dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (**2g**) was prepared using procedure A from 3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.22 g, 3.8 mmol) to yield 24% (0.31 g, 0.911 mmol) of the title compound and using procedure B to yield 52% (0.67 g, 1.976 mmol) of a crystalline yellow solid. Mp. 169–170 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1739 cm^{-1} .

For $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{S}$ (338.2) calculated: 53.27% C, 2.69% H, 4.14% N, 9.48% S; found: 53.08% C, 2.67% H, 4.10% N, 9.55% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.29 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.40$ Hz, H5), 7.86–7.80 (m, 1H, H7), 7.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H2'), 7.55 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H5'), 7.45–7.37 (m, 3H, H6, H8, H6'), 5.61 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 191.9, 149.8, 145.4, 136.7, 136.5, 131.5, 131.2, 130.5, 129.9, 129.4, 127.8, 125.9, 120.7, 116.7, 51.0.

5.1.9. 6-Bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one (**2h**)

6-Bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one (**2h**) was prepared using procedure A from 6-bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-dione (1.52 g, 3.8 mmol) to yield 23% (0.37 g, 0.875 mmol) of the title compound and using procedure B to yield 30% (0.48 g, 1.141 mmol) of a crystalline yellow solid. Mp. 180–183 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1739 cm^{-1} .

For $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{BrCl}_2\text{NO}_2\text{S}$ (417.1) calculated: 43.16% C, 1.93% H, 3.36% N, 7.69% S; found: 43.33% C, 2.00% H, 3.31% N, 7.58% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H5), 8.00 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H7), 7.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H2'), 7.57 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H5'), 7.44 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H8), 7.39 (dd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H6'), 5.59 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 190.4, 149.0, 145.1, 138.7, 136.4, 133.0, 131.2, 130.5, 129.9, 129.3, 127.9, 122.3, 119.4, 117.5, 51.3.

5.1.10. 6-Chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one (**2i**)

6-Chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one (**2i**) was prepared using procedure A from 6-chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-dione (1.36 g, 3.8 mmol) to yield 21% (0.30 g, 0.833 mmol) of the title compound and using procedure B to yield 27% (0.38 g, 1.025 mmol) of a crystalline yellow solid. Mp. 157–160 °C, IR $\nu_{C=O}$ 1756 cm^{-1} .

For $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$ (372.7) calculated: 48.32% C, 32.16% H, 3.76% N, 8.60% S; found: 48.42% C, 2.05% H, 3.39% N, 8.29% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.20 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz, H5), 8.00 (dd, 1H, $J = 9.0$ Hz, $J = 3.0$ Hz, H7), 7.71 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H2'), 7.56 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H5'), 7.52 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz, H8), 7.39 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H6'), 5.59 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 190.5, 148.6, 145.1, 136.4, 135.9, 131.2, 130.5, 130.0, 129.9, 129.8, 129.3, 127.9, 121.9, 119.2, 51.3.

5.1.11. 3-Benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3a**)

3-Benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3a**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (0.96 g, 3.8 mmol) to yield 22% (0.24 g, 0.835 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 147–150 °C.

For $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NOS}_2$ (285.0) calculated: 63.13% C, 4.91% N, 3.89% H, 22.47% S; found: 62.88% C, 4.85% N, 3.95% H, 22.38% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.22 (dd, 1H, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H5), 7.90–7.84 (m, 1H, H7), 7.53–7.44 (m, 2H, H6, H8), 7.29–7.18 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 6.20 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 187.1, 178.4, 149.6, 136.9, 134.3, 131.8, 128.5, 127.2, 127.1, 126.6, 121.9, 116.4, 57.

5.1.12. 3-Benzyl-6-bromo-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3b**)

3-Benzyl-6-bromo-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3b**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-bromo-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1.26 g, 3.8 mmol) to yield 21% (0.29 g, 0.795 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 157–160 °C.

For $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrNOS}_2$ (364.9) calculated: 49.46% C, 3.85% N, 2.75% H, 17.61% S; found: 49.32% C, 3.61% N, 2.82% H, 17.75% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H5), 7.54 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, H7), 7.53 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H8), 7.29–7.17 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 6.16 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 185.6, 177.9, 148.9, 139.1, 134.1, 133.2, 128.5, 127.1, 126.6, 123.5, 119.1, 118.8, 57.9.

5.1.13. 3-Benzyl-6-chloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3c**)

3-Benzyl-6-chloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3c**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-chloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1.09 g, 3.8 mmol) to yield 16% (0.20 g, 0.638 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 148–150 °C.

For $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNOS}_2$ (319.0) calculated: 56.33% C, 4.38% N, 3.15% H, 20.05% S; found: 56.28% C, 4.52% N, 3.08% H, 19.95% S.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.13 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H5), 7.93 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H7), 7.60 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H8), 7.34–7.18 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 6.17 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 185.8, 178.0, 148.5, 136.3, 134.1, 130.9, 130.2, 128.5, 127.2, 126.6, 123.1, 118.9, 58.0.

5.1.14. 3-Benzyl-6-methyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3d**)

3-Benzyl-6-methyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (**3d**) was prepared using procedure A from 3-benzyl-6-methyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1.02 g, 3.8 mmol) to yield 15% (0.17 g,

0.571 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 118–119 °C.

For $C_{16}H_{13}NOS_2$ (299.0) calculated: 64.18% C, 4.68% N, 4.38% H, 21.42% S; found: 64.32% C, 4.63% N, 4.23% H, 21.60% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H5), 7.69 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H7), 7.43 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H8), 7.31–7.19 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 6.20 (s, 2H, CH₂) 2.39 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 187.0, 178.3, 147.9, 137.8, 136.8, 134.4, 131.1, 128.4, 127.1, 126.5, 121.6, 116.2, 57.6, 20.6.

5.1.15. 6-Chloro-3-(4-fluorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3e)

6-Chloro-3-(4-fluorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3e) was prepared using procedure B from 6-chloro-3-(4-fluorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.16 g, 3.8 mmol) to yield 30% (0.39 g, 1.139 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 147–150 °C.

For $C_{15}H_6ClFNOS_2$ (337.8) calculated: 53.33% C, 4.15% N, 2.69% H, 18.98% S; found: 53.52% C, 3.86% N, 2.80% H, 18.99% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.12 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, H5), 7.91 (dd, 1H, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.6$ Hz, H7), 7.59 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H8), 7.42–7.32 (2H, m, H2', H6'), 7.16–7.06 (m, 2H, H3', H5'), 6.13 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 8, 178.0, 161.4 (d, $J = 242.8$ Hz), 148.5, 136.3, 130.9, 130.2 (d, $J = 3.2$ Hz), 130.1, 128.8 (d, $J = 8.0$ Hz), 123.2, 118.9, 115.2 (d, $J = 21.5$ Hz), 57.4.

5.1.16. 6,8-Dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3f)

6,8-Dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3f) was prepared using procedure B from 6,8-dichloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.49 g, 3.8 mmol) to yield 51% (0.82 g, 1.938 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 178–181 °C.

For $C_{15}H_7Cl_4NOS_2$ (420.9) calculated: 42.57% C, 3.31% N, 1.67% H, 15.16% S; found 42.31% C, 3.05% N, 1.68% H, 15.40% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H5), 8.06 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H7), 7.68 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H2'), 7.55 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H5'), 7.37 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, H6'), 6.09 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 185.2, 177.2, 145.3, 135.3, 135.2, 131.2, 130.5, 130.4, 129.7, 129.1, 128.5, 127.2, 124.3, 121.3, 57.6.

5.1.17. 3-(3,4-Dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3g)

3-(3,4-Dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3g) was prepared using procedure B from 3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.22 g, 3.8 mmol) to yield 42% (0.565 g, 1.595 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 170–172 °C.

For $C_{15}H_9Cl_2NOS_2$ (354.3) calculated: 50.85% C, 3.95% N, 2.56% H, 18.10% S; found 50.56% C, 3.85% N, 2.49% H, 18.14% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.25–8.17 (m, 1H, H5), 7.91–7.83 (m, 1H, H7), 7.67 (s, 1H, H2'), 7.56–7.42 (m, 3H, H6, H8, H5'), 7.37–7.30 (m, 1H, H6'), 6.13 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 187.5, 178.6, 149.8, 136.9, 135.8, 131.6, 131.2, 130.5, 129.6, 128.7, 127.1, 127.0, 122.2, 116.3, 57.2.

5.1.18. 6-Bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3h)

6-Bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3h) was prepared using procedure B from 6-bromo-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.52 g, 3.8 mmol) to yield 43% (0.71 g, 1.634 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 168–171 °C.

For $C_{15}H_8BrCl_2NOS_2$ (430.8) calculated: 41.59% C, 3.23% N, 1.86% H, 14.81% S; found 41.37% C, 2.87% N, 1.98% H, 15.10% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.25 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H5), 8.03 (dd, 1H, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz, H7), 7.68 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H2'), 7.54 (d overlapped, 1H, $J = 8.2$ Hz, H5'), 7.52 (d overlapped, 1H, $J = 8.8$ Hz, H8), 7.35 (dd 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H6'), 6.10 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 185.9, 178.2, 149.1, 139.0, 135.6, 133.0, 131.2, 130.5, 129.7, 128.6, 127.2, 123.7, 119.0, 118.7, 57.4.

5.1.19. 6-Chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3i)

6-Chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dithione (3i) was prepared using procedure B from 6-chloro-3-(3,4-dichlorobenzyl)-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-dione (1.36 g, 3.8 mmol) to yield 42% (0.62 g, 1.595 mmol) of the title compound as a crystalline red solid. Mp. 183–185 °C.

For $C_{15}H_8Cl_3NOS_2$ (388.7) calculated: 46.35% C, 3.60% N, 2.07% H, 16.50% S; found 46.09% C, 3.35% N, 1.97% H, 16.49% S.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.11 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H5), 7.91 (dd, 1H, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.5$ Hz, H7), 7.67 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, H2'), 7.59 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H8), 7.542 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H5'), 7.35 (dd 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.4$ Hz, H6'), 6.10 (s, 2H, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 186.0, 178.2, 148.7, 136.2, 135.5, 131.2, 130.8, 130.5, 130.0, 129.7, 128.6, 127.2, 123.3, 118.8, 57.4.

5.2. Biology

5.2.1. Antimycobacterial assay

5.2.1.1. Antimycobacterial susceptibility testing. For the *in vitro* evaluation of the antimycobacterial activity of the substances, the following strains were used: *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 (identical with H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (identical with ATCC 12 478), *M. avium* CNCTC My 330/88 (identical with ATCC 25291), obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague, and a clinical isolate of *M. kansasii* 6509/96. The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague). This medium (with bovine serum) is routinely used in the Czech Republic. Each strain was simultaneously inoculated into a Petri dish containing the Löwenstein–Jensen medium for the control of sterility of the inoculum and its growth. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2, 1 and 0.5 $\mu\text{mol/L}$. The MICs were determined after incubation at 37 °C for 14 days and 21 days. The MIC was the lowest concentration of the antimycobacterially effective substance (on the above concentration scale) at which the inhibition of the growth of mycobacteria occurred. The evaluation was repeated three times and the values of the MIC were the same.

5.2.2. Antiproliferative and cytotoxic assay

5.2.2.1. Cells and culture conditions. Cell proliferation and cytotoxicity assays using various cancer cell line models are among the basic assays used to assess the efficacy and potency of different anti-cancer compounds. Therefore, we used the following cell lines:

Cells	Cell culture medium
• HUVEC (ATCC CRL-1730)	DMEM (CAMBREX 12-614F)
• K-562 (DSM ACC 10)	RPMI 1640 (CAMBREX 12-167F)
• HeLa (DSM ACC 57)	RPMI 1640 (CAMBREX 12-167F).

Cells were grown in the appropriate cell culture medium supplemented with 10 mL/L ultraglutamine 1 (CAMBREX 17-605E/U1), 500 $\mu\text{L/L}$ gentamicin sulfate (CAMBREX 17-518Z), and 10% heat

inactivated fetal bovine serum (PAA A15-144) at 37 °C in high density polyethylene flasks (NUNC 156340).

5.2.3. Antiproliferative assay

The test substances were dissolved in DMSO before being diluted in DMEM. The adherent cells were harvested at the logarithmic growth phase after soft trypsinization, using 0.25% trypsin in PBS containing 0.02% EDTA (Biochrom KG L2163). For each experiment approximately 10,000 cells were seeded with 0.1 mL culture medium per well of the 96-well microplates (HUVEC: NUNC 167008, K-562: NUNC 163320). To test the antiproliferative effect of compounds on HUVEC and K-562, the cells were incubated for 72 h in plates prepared with control and different dilutions of test substances.

5.2.4. Cytotoxic assay

For the cytotoxicity assay, HeLa cells were preincubated for 48 h without the test substances. To test the cytotoxic effect of compounds on HeLa, the dilutions of the compounds were carried out carefully on the subconfluent monolayers of HeLa cells after the preincubation time. After the incubation time, the cytolytic effects of compounds were analysed in comparison with the negative control.

5.2.5. Condition of incubation

The cells were incubated with dilutions of the test substances in microplates for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO₂. This incubation was found to be an optimum time for the evaluation of the cytotoxicity and the inhibition of cell proliferation by finding out the number of viable cells stained with the CellTiter-Blue[®] reagent or methylene blue.

5.2.6. Method of evaluation

We used different methods to measure cell proliferation and cytotoxicity. For estimating the influence of chemical compounds on cell proliferation of K-562, the metabolic capacity of viable cells present in multiwell plates were measured using the CellTiter-Blue[®] assay (PROMEGA), employing the indicator dye resazurin. Viable cells of untreated control retain the ability to reduce resazurin into resorufin, whereas nonviable cells rapidly lose their metabolic capacity and do not reduce the indicator dye.

The adherent HUVEC and HeLa cells were fixed by glutaraldehyde (MERCK 1.04239.0250) and stained with a 0.05% solution of methylene blue (SERVA 29198) for 15 min. After gently washing, the stain was eluted with 0.2 mL of 0.33 N HCl in the wells. The optical densities were measured at 660 nm in a SUNRISE microplate reader (TECAN).

The GI₅₀ and CC₅₀ values were defined as being where the dose response curve intersected the 50% line, compared to the untreated control. These comparisons of the different values were performed with the software Magellan (TECAN). The GI₅₀ and CC₅₀ values were defined as being where the dose response curve intersected the 50% line, compared to the untreated control. These comparisons of the different values were performed using the software Magellan (TECAN).

Acknowledgements

This work is a part of the research project No. MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

References

- [1] J. Adamec, R. Beckert, D. Weiss, V. Klimešová, K. Waisser, U. Möllmann, J. Kaustová, V. Buchta, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 2898–2906.
- [2] K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, U. Möllmann, H.M. Dahse, M. Miko, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 339 (2006) 616–620.
- [3] R. Doležal, S. Van Damme, P. Bultinck, K. Waisser, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 869–876.
- [4] V. Klimešová, J. Kocí, K. Waisser, J. Kaustová, U. Möllmann, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 2286–2293.
- [5] D.J. Hlasta, J.P. Demers, B.D. Folen, S.A. Fraga-Spano, J. Guan, J.J. Hilliard, M. J. Macielag, K.A. Ohemeng, C.M. Sheppard, Z. Sui, G.C. Webb, M.A. Weidner-Wells, H. Werblood, J.F. Barrett, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 1923–1928.
- [6] M.J. Macielag, J.P. Demers, S.A. Fraga-Spano, D.J. Hlasta, S.G. Johnson, R. M. Konojia, R.K. Russell, Z. Sui, M.A. Weidner-Wells, H. Werblood, B.D. Folen, R. M. Golschmidt, M.J. Loeloff, G.C. Webb, J.F. Barred, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2939–2945.
- [7] S. Houston, A. Franning, *Drugs* 48 (1994) 689–708.
- [8] G. Winder, P.B. Collins, J. Wheland, *J. Gen. Microbiol.* 66 (1971) 379–380.
- [9] E. Wang, R. Langley, G. Gulten, L.G. Dover, G.S. Besra, W.R. Jacobs Jr., J. C. Sacchettini, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 71–78.
- [10] K. Waisser, M. Peřina, P. Holý, M. Pour, O. Bureš, J. Kuneš, V. Klimešová, V. Buchta, P. Kubanová, J. Kaustová, *Arch. Pharm.* 336 (2003) 322–335.
- [11] K. Waisser, M. Peřina, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, *Farmacologia* 58 (2003) 1137–1149.
- [12] K. Waisser, M. Peřina, V. Klimešová, J. Kaustová, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 68 (2003) 1275–1294.

PETRLÍKOVÁ E., WAISSER, K., PALÁT, K., KUNEŠ, J.,
KAUSTOVÁ, J.: New Group of Potential Antituberculotics:
N-(2-Pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-
Pyridylmethyl)salicylamides. *Chem. Pap.*, under review.

32

33

Introduction

34

35 Tuberculosis has always been a serious problem in developing countries and the
36 multidrug resistant strains of *M. tuberculosis* are being transferred by the migration of a
37 population to Europe and North America. WHO (2009) estimated that in Europe there were
38 463,500 new cases of tuberculosis in the year 2007. The research of antituberculosics with a
39 new structure and a new mechanism of action has always belonged to the main topics of
40 medicinal chemistry. Sixty-six new papers were published in the field of heterocyclic
41 compounds showing activity against mycobacteria in the year 2009 (according to *The*
42 *Chemical Abstracts*).

43 The results of the research which took place in New Jersey have demonstrated that the
44 antibacterial mechanism of salicylanilides is probably different from that of other antibacterial
45 drugs, and salicylanilides can serve as bacterial two-component system inhibitors (Hlasta,
46 1998, Macielang, 1998). This type of mechanism of action seems to be very promising, and
47 the team at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové has been oriented on the development
48 of new potential antituberculosics since then. The research was mainly focused on different
49 modifications of the salicylamide molecule. *N*-benzylsalicylamides, *N*-benzylpicolinanilides,
50 *N*-benzylpicolinamides, 2-sulfanylbenezanilides and *N*-benzyl-2-sulfanylbenezamides have
51 been prepared and tested against some mycobacterial strains (Waisser, 2003b

52 This paper is a part of an overall study dealing with salicylamides. Previously prepared
53 *N*-benzylsalicylamides (Waisser, 2003a) possess low solubility in water, which caused
54 problems with biological testing in some cases. *N*-(3-Pyridylmethyl)salicylamides were
55 prepared in order to increase the solubility in water and in the medium.

56 Since the QSAR analysis has been successfully used many times for the prediction of
57 new antimycobacterially active derivatives (Nemeček, 2009, Revathi, 2009), another goal of
58 this paper is the QSAR analysis of newly prepared compounds. Having found that there exists
59 a correlation between antimycobacterial activity and lipophilicity expressed by the calculated
60 log *P* (partition coefficients of octanol-water system), it was necessary to verify the accuracy
61 of these calculated values against the experimental ones. Thin layer chromatography on the
62 reverse phase was employed for this verification as it is also recommended in the literature
63 (Kaliszan, 1984).

64 A quantum-chemical calculation of the optimal geometry for these molecules has been
65 performed. The measurement of the hydrogen bond between the hydroxide and the carbonyl
66 groups of the salicylic moiety by infrared spectroscopy completes this research.

67

68

Theoretical

69 *Mathematical modeling*

70

71 All regression calculations were set up using the Linreg and Multireg programs for
72 Microsoft Excel. Quantum-chemical calculations were performed using the program Gaussian
73 03W, version 6.1, revision-E.01 (Gaussian, Inc.). Geometry of the molecules was optimized
74 using the B3LYP/6-311+G (d,p) method. Possible starting conformations for the
75 optimizations on the DFT level were searched for by simulated heating (from 0 to 800 K),
76 using molecular dynamics on the RM1 level. The software HyperChem 8.0.4 (HyperCube,
77 Inc.) was employed for these calculations. Models were visualized by using the software
78 GaussView, v. 4.1.2; (Gaussian, Inc.).

79

80 *Calculations*

81 All regression calculations for the lipophilicity study were set up using the Linreg and
82 Multireg programs for Microsoft Excel. Logarithms of the partition coefficient were
83 calculated using the ChemBioOffice.

84

85

Experimental

86

87 **Chemistry**

88 *General information*

89 The melting points were determined on a Kofler apparatus. The samples for the
90 analyses and antimycobacterial tests were dried over P₂O₅ at 61 °C and 66 Pa for 24 h.

91 Elemental analyses (C, H, N) were performed on a CHNS-O CE elemental analyzer
92 (Fisions EA 1110, Milan) and were within ±0.4 % of the theoretical values.

93 The standard IR spectra were measured in KBr pellets on a Nicolet Impact 400
94 apparatus; the wavenumbers are given in cm⁻¹. Infrared absorption spectra for the study of
95 hydrogen bonds in molecules were recorded on a Nicolet 6700 FTIR spectrometer purged
96 with dried and purified air (128 scans, resolution 4 cm⁻¹, detector DTGS, 4000-3000 cm⁻¹) in a
97 5 cm SiO₂ cell in tetrachloromethane (dried over P₂O₅, and then purified by distillation).

98 Concentration of the solutions was $2 \cdot 10^{-4}$ mol/L. The spectra were measured against air as a
99 background, and then the spectra of solvents were subtracted manually.

100 The ^1H and ^{13}C NMR spectra of new compounds were recorded in $\text{DMSO-}d_6$
101 solutions at room temperature on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300
102 MHz for ^1H NMR and 75 MHz for ^{13}C NMR. Chemical shifts were recorded as δ values in
103 parts per million (ppm), and were indirectly referenced to tetramethylsilane *via* the solvent
104 signal (2.49 for ^1H or 39.7 for ^{13}C for $\text{DMSO-}d_6$).

105 TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator Silufol
106 UV 254 (RP-18 F_{254s} of Merck Company) and impregnated with trioctadecyl silane. Aqueous
107 acetone (60 %) was used as the mobile phase.

108

109 *General procedure of synthesis of phenyl salicylates*

110 A mixture of substituted salicylic acid (1 mol) and phenol (1 mol) was heated with the
111 presence of phosphorus oxychloride (0.38 mol) at 75-80 °C for 4 hours under a reflux
112 condenser. Then, the reaction mixture was reduced to a molten mass and poured slowly into a
113 5% solution of sodium carbonate (100 ml) with continuous stirring. The precipitated ester was
114 collected on a filter and washed four times with 20 ml portions of water. The crude product
115 was crystallized from ethanol.

116

117 *General procedure of synthesis of N-(2-pyridylmethyl)salicylamides*

118 A mixture of an amine (1g) and phenyl salicylate (1.2 equivalents) was melted at 70-
119 90 °C for 180 min. The reaction mixture was then heated at reflux with 96% ethanol for 10
120 minutes, and then filtered off, and the product was crystallized from 96% ethanol.

121

122 *General procedure of synthesis of N-(3-pyridylmethyl)salicylamides*

123 A mixture of an amine (1g) and phenyl salicylate (1.2 equivalents) was melted at 190-
124 210 °C for 90 min. The reaction mixture was then heated at reflux with 96% ethanol for 10
125 minutes, and then filtered off, and the product was crystallized from 96% ethanol.

126

127 **Microbiology**

128 The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula
129 semisynthetic medium (SEVAC, Prague). This medium (with bovine serum) is routinely used
130 in the Czech Republic. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The
131 final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 16, 8, 4, and 2 $\mu\text{mol/l}$. The MICs

132 were determined after incubation at 37°C for 14 days and 21 days. The evaluation was
133 repeated three times.

134

135 The study of intramolecular hydrogen bonds

136 The study of intramolecular hydrogen bonds between the hydrogen atom of a phenol
137 OH group and the oxygen atom of carbonyl group in synthesized molecules was made in
138 diluted tetrachloromethane solutions ($c=2 \cdot 10^{-4}$ mol/L). At such dilution, intermolecular bonds
139 do not exist, and only monomers are observed. The shift $\Delta\nu(\text{OH})$ calculated for the phenol as
140 the reference molecule is in the range of 204-222 cm^{-1} for 2-pyridyl derivatives and 142-185
141 cm^{-1} for 3-pyridyl compounds.

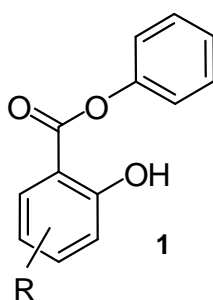
142

143

Results and discussion

144 A series of nineteen derivatives of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamide and *N*-(3-
145 pyridylmethyl)salicylamide was synthesized. The method for the preparation of salicylamides
146 from salicylic acid, phenylmethylamine and phosphorous trichloride failed (Waisser, 2001).
147 *N*-(pyridylmethyl)salicylamides were prepared by the treatment of phenyl salicylate (or
148 substituted phenyl salicylates) with 2-picolinylamine or 3-picolinylamine. The phenyl
149 salicylates were prepared by modification of the approach from the paper (Organic Synthesis,
150 1963). The overview of the starting phenyl salicylates is given in Table 1. The synthesis of *N*-
151 (2-pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides is presented in Scheme
152 2. Yields, melting points and $\nu(\text{C}=\text{O})$ are summarized in Table 2.

153

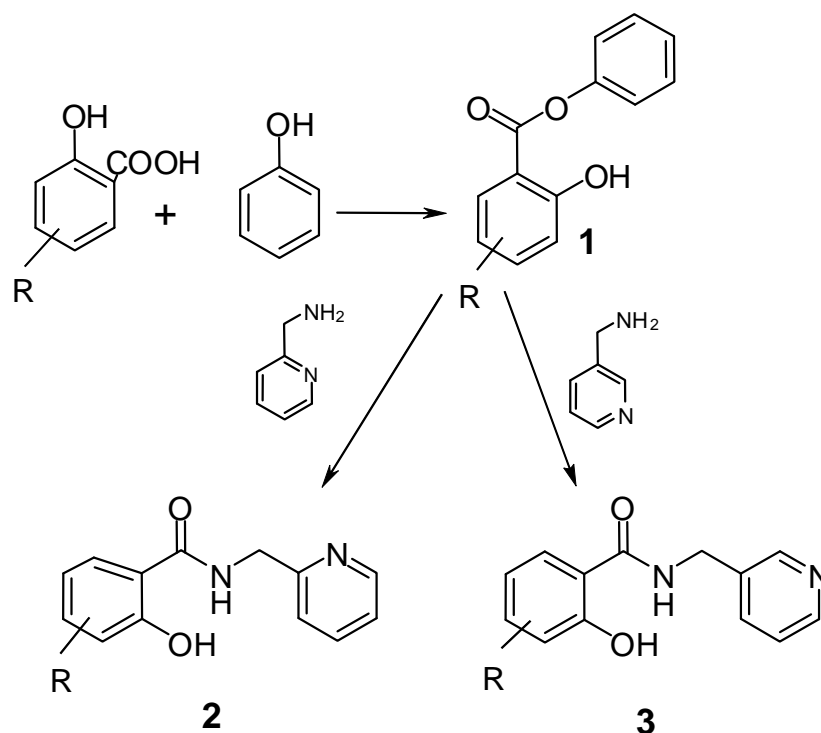


	R		R		R
1a	H	1e	4-OCH ₃	1i	5-Br
1b	3-CH ₃	1f	4-Cl	1j	3,5-Cl ₂
1c	3-OCH ₃	1g	5-F	1k	3,5-Br ₂
1d	4-CH ₃	1h	5-Cl		

154

155 **Table 1.** Overview of phenyl salicylates.

156



157

158

159 **Figure 1.** Synthesis of of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-
160 pyridylmethyl)salicylamides.

161

162 **Table 2.** Yield, melting point and carbonyl frequency in IR of new compounds.

Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	$\nu_{(C=O)}$ (cm ⁻¹)	Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	$\nu_{(C=O)}$ (cm ⁻¹)
1a	70	42 - 43 ^{c)}	-	2g	31	119 – 121	1653
1b	64	42.5 - 43	1685	2h	46	160 – 161 ^{a)}	1628
1c	64	66.5 – 69	1684	2i	80	178 – 179	1651
1d	65	43 – 43.5	1685	2k	53	170 – 171	1640
1e	65	57	1672	3a	64	167 – 170	1638
1f	75	49 – 52	1672	3b	66	122 – 124	1637
1g	76	84 – 85	1679	3c	66	110 – 111	1642
1h	78	95 – 97,5	1685	3d	52	168 – 171	1644
1i	84	112 – 113	1692	3e	51	137 – 138	1651
1j	75	112 - 113	1700	3f	70	181 – 184	1637
1k	82	126 - 127	1686	3g	81	213 – 217	1648

2b	47	145 – 146 ^{b)}	1636	3h	95	178	1636
2c	19	125 – 126	1638	3i	84	166 – 168	1643
2d	20	133 – 134	1650	3j	86	174 – 175	1642
2f	48	132 – 134	1645	3k	48	177 – 179	1640

^{a)}Litt. 158–160 °C (Bayer Aktiengesellschaft, 1975), ^{b)}Litt. 140–142 °C (Bayer Aktiengesellschaft, 1975), ^{c)}Litt. 42–43 °C (Organic Synthesis, 1955).

165

The structural assignment of the compounds is based on ¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectra and elemental analysis. In the IR spectra, the carbonyl vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ was observed between 1642-1692 cm^{-1} for phenyl salicylates and between 1628-1653 cm^{-1} for *N*-(pyridylmethyl)salicylamides. The NMR spectra of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides are given in Table 3 and elemental analyses in Table 4.

171

Table 3. NMR spectra of derivatives of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides and *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides.

174

Compounds	NMR
2b	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13.07 (1H, bs, OH), 9.50 (1H, t, <i>J</i> =5.9 Hz, NH), 8.54-8.49 (1H, m, H6'), 7.82-7.71 (2H, m, H6, H4'), 7.36-7.22 (3H, m, H4, H3', H5'), 6.80 (1H, t, <i>J</i> =7.6 Hz, H5), 4.59 (2H, d, <i>J</i> =5.9 Hz, CH ₂), 2.15 (3H, s, CH ₃). ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 170.6, 159.5, 158.1, 149.1, 137.0, 134.8, 126.2, 124.8, 122.4, 121.2, 118.0, 113.6, 44.5, 15.6.
2c	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.49 (1H, bs, OH), 9.42 (1H, t, <i>J</i> =5.7 Hz, NH), 8.53-8.49 (1H, m, H6'), 7.76 (1H, dt, <i>J</i> =7.6 Hz, <i>J</i> =1.8 Hz, H4'), 7.50 (1H, dd, <i>J</i> =8.1 Hz, <i>J</i> =1.2 Hz, H6), 7.33 (1H, d, <i>J</i> =8.1 Hz, H4), 7.30-7.23 (1H, m, H3'), 7.15-7.08 (1H, m, H5'), 6.84 (1H, t, <i>J</i> =8.1 Hz, H5), 4.59 (2H, d, <i>J</i> =5.7 Hz, CH ₂), 3.78 (3H, s, OCH ₃). ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.5, 158.1, 150.7, 149.1, 148.6, 137.0, 122.4, 121.3, 119.1, 118.2, 115.7, 115.4, 56.0, 44.5.
2d	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 12.33 (1H, bs, OH), 9.36 (1H, t, <i>J</i> =5.7 Hz, NH), 8.53-8.49 (1H, m, H6'), 7.81 (1H, d, <i>J</i> =8.2 Hz, H6), 7.75 (1H, td, <i>J</i> =7.6 Hz, <i>J</i> =1.8 Hz, H4'), 7.33 (1H, d, <i>J</i> =7.6 Hz, H3'), 7.30-7.23 (1H, m, H5'), 6.76-6.69 (2H, m, H3, H5), 4.59 (2H, d, <i>J</i> =5.7 Hz, CH ₂), 2.27 (3H, s, CH ₃). ¹³ C NMR (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.2, 160.1, 158.2, 149.1, 144.4, 136.9, 128.0, 122.4, 121.3, 119.9,

117.7, 112.8, 44.5, 21.2.

- 2f** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.63 (1H, bs, OH), 9.46 (1H, t, $J=5.4$ Hz, NH), 8.51 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H6'), 7.94 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H6), 7.76 (1H, td, $J=8.0$ Hz, $J=1.8$ Hz, H4'), 7.34 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H3'), 7.30-7.23 (1H, m, H5'), 7.03-6.95 (2H, m, H3, H5), 4.61 (2H, d, $J=5.4$ Hz, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167.8, 160.4, 157.9, 149.2, 137.8, 137.0, 130.3, 122.5, 121.4, 119.3, 117.2, 115.2, 44.6.
- 2g** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.08 (1H, bs, OH), 9.46 (1H, t, $J=5.4$ Hz, NH), 8.55-8.49 (1H, m, H6'), 7.81-7.71 (2H, m, H6, H4'), 7.40-7.22 (3H, m, H4, H3', H5'), 6.99-6.91 (1H, m, H3), 4.62 (2H, d, $J=5.4$ Hz, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167.4 (d, $J=2.3$ Hz), 157.9, 155.8 (d, $J=1.1$ Hz), 154.9 (d, $J=234.9$ Hz), 149.2, 137.1, 122.5, 121.5, 121.2 (d, $J=32.3$ Hz), 118.9 (d, $J=8.1$ Hz), 116.6 (d, $J=6.3$ Hz), 114.2 (d, $J=24.1$ Hz), 44.7.
- 2h** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.18 (1H, bs, OH), 9.33 (1H, t, $J=5.4$ Hz, NH), 8.38-8.33 (1H, m, H6'), 7.83 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H6), 7.60 (1H, td, $J=7.6$ Hz, $J=1.8$ Hz, H4'), 7.28 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H4), 7.20 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H3'), 7.15-7.08 (1H, m, H5'), 6.80 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 4.45 (2H, d, $J=5.4$ Hz, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167.3, 158.3, 157.8, 149.1, 137.0, 133.4, 128.0, 122.7, 122.5, 121.4, 119.4, 117.5, 44.7.
- 2i** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.38 (1H, bs, OH), 9.49 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.54-8.48 (1H, m, H6'), 8.11 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H6), 7.81-7.72 (1H, m, H4'), 7.59-7.52 (1H, m, H4), 7.36 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H3'), 7.32-7.24 (1H, m, H5'), 6.91 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 4.60 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167.3, 158.7, 157.8, 149.2, 137.1, 136.3, 130.9, 122.5, 121.5, 119.9, 118.0, 110.1, 44.7.
- 2k** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.81 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.51 (1H, dd, $J=4.7$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6'), 8.23 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H6), 7.99 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H4), 7.77 (1H, td, $J=7.6$ Hz, $J=1.8$ Hz, H4'), 7.37 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H3'), 7.29 (1H, dd, $J=7.6$ Hz, $J=4.7$ Hz, H5'), 4.60 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168.5, 157.5, 157.3, 149.2, 138.8, 137.1, 129.4, 122.6, 121.6, 117.0, 112.4, 109.8, 44.8.
- 3a** ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12.38 (1H, bs, OH), 9.38 (1H, bs, NH), 8.57 (1H, s, H2'), 8.46 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H6'), 7.87 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H6), 7.73 (1H, d, $J=7.7$

Hz, H4'), 7.45-7.31 (2H, m, H4, H5'), 6.96-6.84 (2H, m, H3, H5), 4.53 (2H, d, $J=5.8$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.2, 160.1, 149.1, 148.4, 135.4, 134.7, 134.0, 128.1, 123.7, 118.9, 117.6, 115.4, 40.4.

3b ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.03 (1H, bs, OH), 9.46 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.56 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H2'), 8.46 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H6'), 7.77-7.67 (2H, m, H6, H4'), 7.40-7.26 (2H, m, H4, H5'), 6.79 (1H, t, $J=7.6$ Hz, H5), 4.52 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂), 2.14 (3H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 170.5, 159.6, 149.1, 148.5, 135.4, 134.9, 134.6, 126.3, 124.8, 123.8, 118.1, 113.4, 40.5, 15.7.

3c ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.50 (1H, bs, OH), 9.37 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.55 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H2'), 8.46 (1H, dd, $J=4.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H6'), 7.76-7.69 (1H, m, H4'), 7.43 (1H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=1.2$ Hz, H6), 7.38-7.32 (1H, m, H5'), 7.13-7.07 (1H, m, H4), 6.82 (1H, t, $J=8.2$ Hz, H5), 4.51 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂), 3.77 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.7, 150.8, 149.1, 148.7, 148.4, 135.4, 134.6, 123.7, 118.9, 118.2, 115.7, 115.1, 56.0, 40.5.

3d ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.42 (1H, bs, OH), 9.29 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.55 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H2'), 8.46 (1H, dd, $J=4.7$ Hz, $J=1.5$ Hz, H6'), 7.80-7.67 (2H, m, H6, H4'), 7.35 (1H, dd, $J=7.7$ Hz, $J=4.7$ Hz, H5'), 6.75-6.67 (2H, m, H3, H5), 4.50 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂), 2.26 (3H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.4, 160.4, 149.1, 148.4, 144.6, 135.4, 134.8, 127.8, 123.7, 119.9, 117.7, 112.5, 40.5, 21.3.

3e ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.85 (1H, bs, OH), 9.22 (1H, t, $J=5.9$ Hz, NH), 8.58-8.52 (1H, m, H2'), 8.49-8.42 (1H, m, H6'), 7.80 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H6), 7.75-7.68 (1H, m, H4'), 7.35 (1H, dd, $J=7.6$ Hz, $J=4.7$ Hz, H5'), 6.51-6.39 (2H, m, H3, H5), 4.50 (2H, d, $J=5.9$ Hz, CH₂), 3.76 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.5, 163.9, 162.8, 149.1, 148.4, 135.4, 134.9, 129.1, 123.8, 107.8, 106.4, 101.4, 55.6, 44.2.

3f ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.63 (1H, bs, OH), 9.37 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.56 (1H, s, H2'), 8.46 (1H, d, $J=4.1$ Hz, H6'), 7.88 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.76-7.69 (1H, m, H4'), 7.35 (1H, dd, $J=7.7$ Hz, $J=4.1$ Hz, H5'), 7.02-6.93 (2H, m, H3, H5), 4.52 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.1, 160.7, 149.1, 148.5, 137.9, 135.5, 134.6, 130.0, 123.8, 119.2, 117.2, 114.9, 40.4.

3g ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.08 (1H, bs, OH), 9.35 (1H, t, $J=5.6$ Hz, NH), 8.56 (1H, s, H2'), 8.49-8.43 (1H, m, H6'), 7.79-7.63 (2H, m, H6, H4'), 7.42-7.20

(2H, m, H4, H5'), 6.94 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3), 4.52 (2H, d, $J=5.6$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.8 (d, $J=2.3$ Hz), 156.4, 154.8 (d, $J=234.4$ Hz), 149.2, 148.5, 135.5, 134.6, 123.8, 121.0 (d, $J=23.6$ Hz), 119.0 (d, $J=7.5$ Hz), 116.2 (d, $J=6.9$ Hz), 114.0 (d, $J=24.8$ Hz), 40.5.

3h ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.38 (1H, bs, OH), 9.40 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.58 (1H, s, H2'), 8.45 (1H, d, $J=4.5$ Hz, H6'), 7.95 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.70 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H4'), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.25 (1H, dd, $J=7.7$ Hz, $J=4.5$ Hz, H5'), 6.90 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 4.52 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.7, 158.5, 149.2, 148.5, 135.5, 134.5, 133.5, 127.7, 123.7, 122.6, 119.5, 117.1, 40.5.

3i ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.38 (1H, bs, OH), 9.39 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.56 (1H, s, H2'), 8.47 (1H, d, $J=4.5$ Hz, H6'), 8.05 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.73 (1H, d, $J=7.7$ Hz, H4'), 7.54 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.36 (1H, dd, $J=7.7$ Hz, $J=4.5$ Hz, H5'), 6.90 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 4.52 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.6, 159.0, 149.2, 148.5, 136.4, 135.5, 134.5, 130.6, 123.8, 119.9, 117.7, 110.0, 40.5.

3j ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.52 (1H, bs, OH), 9.73 (1H, t, $J=5.4$ Hz, NH), 8.58 (1H, s, H2'), 8.48 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H6'), 8.01 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 7.76 (1H, d overlapped, $J=2.1$ Hz, H4), 7.79-7.72 (1H, m, H4'), 7.37 (1H, dd, $J=7.6$ Hz, $J=4.7$ Hz, H5'), 4.53 (2H, d, $J=5.4$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.5, 155.9, 149.2, 148.6, 135.7, 133.9, 133.4, 125.9, 123.8, 122.6, 122.2, 116.5, 40.7.

3k ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.68 (1H, bs, OH), 9.74 (1H, t, $J=5.7$ Hz, NH), 8.57 (1H, s, H2'), 8.48 (1H, d, $J=4.7$ Hz, H6'), 8.16 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 7.97 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H4), 7.75 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H4'), 7.37 (1H, dd, $J=7.6$ Hz, $J=4.7$ Hz, H5'), 4.53 (2H, d, $J=5.7$ Hz, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.4, 157.3, 149.2, 148.6, 138.8, 135.7, 133.9, 129.3, 123.8, 116.8, 112.4, 109.8, 40.7.

175

176

177 **Table 4.** Elemental analysis.

Compound	Formula	M_r	$w_i(\text{calculated; \%}) / w_i(\text{found; \%})$		
			C	H	N
2b	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	242.28	69.41 / 69.99	5.82 / 5.99	11.56 / 11.74

2c	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃	258.28	65.11 / 64.81	5.46 / 5.61	10.85 / 10.87
2d	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	242.28	69.41 / 68.99	5.82 / 6.01	11.56 / 11.63
2f	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	262.70	59.44 / 59.25	4.22 / 4.22	10.66 / 10.37
2g	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₂	246.24	63.41 / 63.11	4.50 / 4.52	11.38 / 11.13
2h	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	262.70	59.44 / 59.22	4.22 / 4.39	10.66 / 10.62
2i	C ₁₃ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	307.15	50.84 / 50.87	3.61 / 3.63	9.12 / 8.85
2k	C ₁₃ H ₁₀ Br ₂ N ₂ O ₂	386.04	40.45 / 39.93	2.61 / 2.48	7.26 / 6.97
3a	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	228.25	68.41 / 68.27	5.30 / 5.23	12.27 / 12.17
3b	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	242.28	69.41 / 69.09	5.82 / 5.77	11.56 / 11.37
3c	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃	258.28	65.11 / 64.94	5.46 / 5.49	10.85 / 10.55
3d	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	242.28	69.41 / 69.52	5.28 / 5.71	11.56 / 11.55
3e	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₃	258.28	65.11 / 64.72	5.46 / 5.40	10.85 / 10.53
3f	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	262.70	59.44 / 59.44	4.22 / 4.29	10.66 / 10.26
3g	C ₁₃ H ₁₁ FN ₂ O ₂	246.24	63.41 / 63.17	4.50 / 4.47	11.38 / 11.08
3h	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	262.70	59.44 / 60.38	4.22 / 4.43	10.66 / 10.16
3i	C ₁₃ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	307.15	50.84 / 50.67	3.61 / 3.50	9.12 / 8.87
3j	C ₁₃ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	297.14	52.55 / 52.29	3.39 / 3.29	9.43 / 9.22
3k	C ₁₃ H ₁₀ Br ₂ N ₂ O ₂	386.04	40.45 / 40.32	2.61 / 2.56	7.26 / 6.92

178

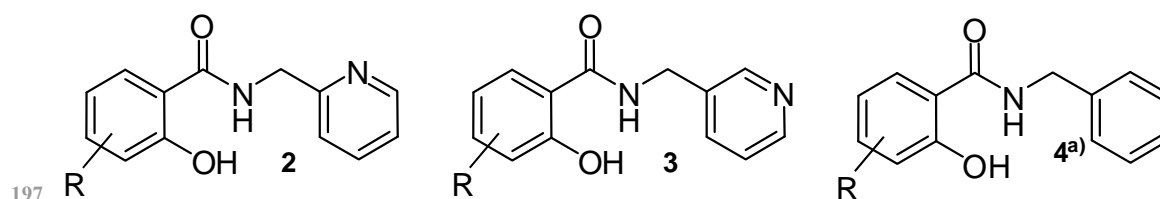
179

180 The *N*-(pyridylmethyl)salicylamides under study were screened for their *in vitro*
181 antimycobacterial activity against two mycobacterial strains: *Mycobacterium tuberculosis*
182 CNCTC My 331/ 88 (identical with H37RV and ATCC 27294) and *Mycobacterium avium*
183 CNCTC My 330/ 88 (identical with ATCC 25291). Both these strains were obtained from the
184 Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health,
185 Prague. The mycobacterioses caused by *M. avium* are rare but usually fatal. The
186 antimycobacterial activities of the compounds under study against these strains were
187 determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague) and the results are
188 summarized in Table 5.

189 Lipophilicity of the compounds was calculated (log *P* in octanol-water system) and
190 moreover measured with the help of thin layer chromatography on the reverse phase
191 (expressed by *R_M* values) in order to verify the predicative value of the calculated log *P*. The
192 values of *R_M* and log *P* are also summarized in Table 6.

193

194 **Table 5.** Logarithm of partition coefficients, R_M values from TLC on silicagel impregnated of
 195 trioctadecylsilan and minimum inhibitory concentrations (MIC) on *M. tuberculosis* and *M.*
 196 *avium*.



Compound	MIC ($\mu\text{mol/l}$)				
	Incubation 14d/21d				
R	$\log P$	R_M	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	
2b	3-CH ₃	2.09	0.25	62.5/62,5	125/250
2c	3-CH ₃ O	1.48	-0.12	250/250	1000/1000
2d	4-CH ₃	2.09	0.12	62.5/125	250/500
2f	4-Cl	2.16	0.31	125/250	500/500
2g	5-F	1.76	0.10	500/1000	500/1000
2h	5-Cl	2.16	0.23	125/250	125/250
2i	5-Br	2.43	0.29	250/500	250/250
2k	3,5-Br ₂	3.26	0.55	125/250	- / -
3a	H	1.18	0.02	500/500	500/500
3b	3-CH ₃	1.67	0.23	250/250	500/500
3c	3-CH ₃ O	1.06	-0.16	250/500	1000/1000
3d	4-CH ₃	1.67	0.12	250/500	500/1000
3e	4-CH ₃ O	1.06	-0.03	500/500	1000/1000
3f	4-Cl	1.74	0.23	125/250	250/250
3g	5-F	1.34	0.11	b)/b)	b)/b)
3h	5-Cl	1.74	0.23	500/500	b)/b)
3i	5-Br	2.01	0.21	125/125	b)/b)
3j	3,5-Cl ₂	2.30	0.39	250/500	b)/b)
3k	3,5-Br ₂	2.84	0.50	125/250	1000/1000
4a	H	2.52	0.42	- / - ^{b)}	125/125
4c	3-CH ₃ O	2.39	0.31	- / - ^{b)}	- / - ^{b)}
4e	4-CH ₃ O	2.39	0.42	125 / - ^{b)}	125 / - ^{b)}

4f	4-Cl	3.08	0.65	62/62	62/62
4h	5-Cl	3.08	0.65	62/- ^{b)}	-/ ^{b)}
4i	5-Br	3.53	0.65	-/ ^{b)}	-/ ^{b)}
4j	3,5-Cl ₂	3.64	1.05	32/62	125/125
4k	3,5-Br ₂	4.18	0.95	32/32	125/125
INH				1/1	>250/>250

198 ^{a)}The values of the antimycobacterial activity group of compounds **4** were taken from the ref.
 199 (Waisser, 2003b). ^{b)} MIC values could not be determined due to low solubility.

200

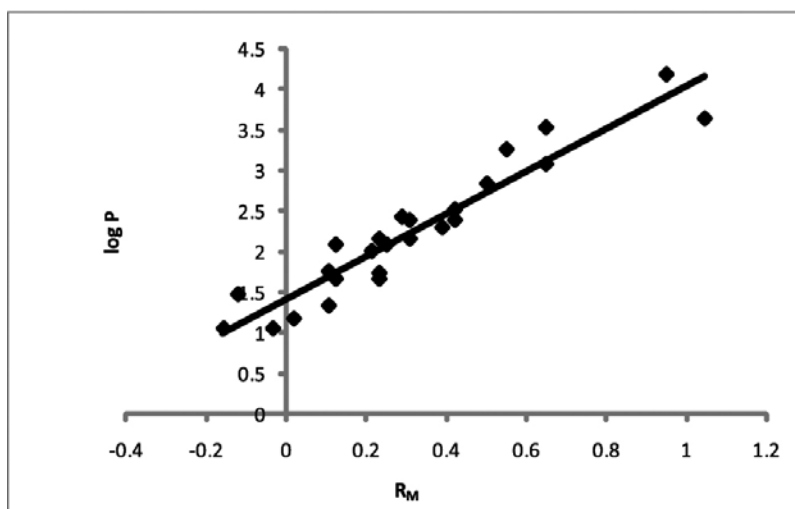
201 We looked for a correlation between the values of R_M and $\log P$ using the Linreg
 202 program, and according to equation 1, it is possible to say that both parameters of lipophilicity
 203 correlated with each other (Fig. 2).

204

$$205 \log P = 2.64 (\pm 0.17) R_M + 1.41 (\pm 0.075) \quad (1)$$

$$206 R = 0.95 \quad s = 0.260 \quad n = 27$$

207



208

209 **Figure 2:** The correlation between $\log P$ and R_M .

210

211 The Hansch approach was carried out in order to study the relationship between the
 212 structure and antimycobacterial activity. The indicator parameter I_1 was used for the
 213 derivatives of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides, while the indicator parameter I_2 for the
 214 derivatives of *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides. Another parameter was lipophilicity
 215 expressed as R_M or $\log P$. As both MICs corresponding to 14d and 21d incubation correlated,
 216 only the MIC values from the 14d incubation experiments were used for calculations.

217

218 We found Eqs. 2 and 3 for the relationships between structure and antimycobacterial
219 activity against *M. tuberculosis*. The statistical significance of these calculated equations for
220 both parameters of lipophilicity (R_M and $\log P$) was similar.

221

$$\begin{aligned} 222 \log \text{MIC}_{M.tb\ 14} = & -0.688 (\pm 0.254) R_M + 0.072 (\pm 0.190) I_1 + 0.269 (\pm 0.194) I_2 + \\ 223 & + 2.249 (\pm 0.216) \end{aligned} \quad (2)$$

$$224 R = 0.80 \quad s = 0.236 \quad n = 23 \quad F = 11.13$$

225

$$\begin{aligned} 226 \log \text{MIC}_{M.tb\ 14} = & -0.267 (\pm 0.089) \log P + 0.141 (\pm 0.163) I_1 + 0.246 (\pm 0.187) I_2 + \\ 227 & + 2.613 (\pm 0.310) \end{aligned} \quad (3)$$

$$228 R = 0.81 \quad s = 0.229 \quad n = 23 \quad F = 12.17$$

229

230 Similar equations were also found for the relationships between the structure and
231 antimycobacterial activity against *M. avium* (See Eq. 4, 5).

232

$$\begin{aligned} 233 \log \text{MIC}_{M.avium\ 14} = & -0.187 (\pm 0.275) R_M + 0.385 (\pm 0.198) I_1 + 0.643 (\pm 0.217) I_2 + \\ 234 & + 2.166 (\pm 0.224) \end{aligned} \quad (4)$$
$$235 R = 0.78 \quad s = 0.258 \quad n = 20 \quad F = 8.36$$

236

$$\begin{aligned} 237 \log \text{MIC}_{M.avium\ 14} = & -0.025 (\pm 0.102) \log P + 0.450 (\pm 0.180) I_1 + 0.709 (\pm 0.221) I_2 + \\ 238 & + 2.116 (\pm 0.344) \end{aligned} \quad (5)$$
$$239 R = 0.78 \quad s = 0.262 \quad n = 20 \quad F = 8.03$$

240

241 Equations 2-5 have a significant level better than 0.05. The significant level of Eq. 1 is
242 better than 0.001. Eqs. 2-5 show that the antimycobacterial activity increases with
243 lipophilicity. It is possible to conclude that the derivatives of *N*-(2-
244 pyridylmethyl)salicylamides are more suitable for the development of new antituberculotics
245 than adequate derivatives of *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides.

246

247 The intramolecular hydrogen bonds between the hydrogen atom of a phenol OH group
248 and the oxygen atom of the carbonyl group were studied. A shift of $\nu(\text{OH})$ band in the
249 phenolic molecules (Table 6) is observed depending on the position and of the nature of the
250 substituent(s). The shift $\Delta\nu(\text{OH})$ calculated for the phenol as the reference molecule is in the

251 range of 204-222 cm^{-1} for 2-pyridyl derivatives and 142-185 cm^{-1} for 3-pyridyl compounds.
 252 These differences correspond to the length of hydrogen bond in calculated 3D models. The
 253 shorter distance between hydrogen and oxygen atoms indicates a stronger interaction which
 254 leads to a higher shift of the band in the IR spectrum. IRs of the intramolecular hydrogen
 255 bond and the calculated length λ of hydrogen bond between OH group and C=O group are
 256 summarized in Table 6.

257

258 **Table 6.** Wavenumbers $\nu(\text{OH})$ of the valence vibration of OH group in CCl_4 solution and the
 259 calculated length λ of hydrogen bond between OH group and C=O group.

260

Compound	$\nu(\text{OH})$ (cm^{-1})	$\Delta\nu(\text{OH})$ (cm^{-1})	$\lambda(\text{\AA})$
2b	3406	205	1.64417
2c	3406	205	1.64684
2d	3407	204	1.66071
2f	3399	212	1.64788
2g	3397	214	1.65933
2h	3395	216	1.65586
2i	3395	216	1.65527
2k	3389	222	1.62770
3a	3468	143	1.67309
3b	3468	143	1.66326
3c	3468	143	1.66451
3d	3469	142	1.66884
3e	3469	142	1.67028
3f	3466	145	1.66280
3g	3467	144	1.67638
3h	3466	145	1.67403
3i	3465	146	1.67642
3j	3464	147	1.65312
3k	3464	147	1.64792
Phenol	3611	-	-

261

262 3D models were created for one derivative of *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides and
 263 for the corresponding derivative of *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides (Fig. 3).



264

265 **Figure 3.** 3D models of compounds **2d** (left) and **3d** (right).

266

267 We believe that our conformations based on the simulated heating calculations are the
 268 most stable conformers but for the molecule **2d** we also calculated models based on different
 269 starting possible conformations stabilised with other hydrogen bonds – **2d_A**, **2d_B** (Table 7).
 270 Geometry optimizations yield models with higher energy compared with the original most
 271 stable conformer. The conformer **2d_B** is planar, but the conformer **2d_A** is not planar.

Formula			
Code	2d	2d_A	2d_B
E_h (kJ/mol)	-2105992.17	-2105958.36	-2105958.81
λ (Å)	1.66071 2.13908	1.93131	1.97334 2.23179

272

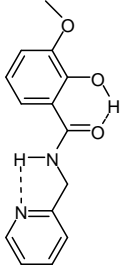
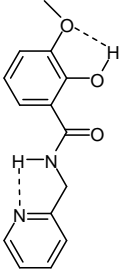
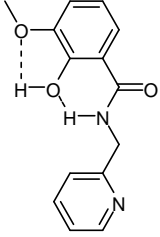
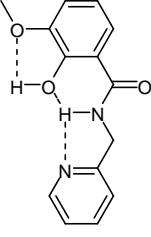
273 **Table 7.** A comparison of three conformers of compound **2d**, their calculated total energy E_h
 274 and the length λ of the possible hydrogen bond(s) (the upper bond in the formula is given
 275 first).

276

277 We also further studied the molecule **2c** and the possible interaction between the methoxy
 278 group and other parts of the molecule (Table 8). We started the geometry optimization from

279 the different planar conformers **2c_A**, **2c_B**, and **2c_C**. We did not obtain any other more stable
 280 conformer than our originally calculated model **2c** with planar arrangement. As far as the new
 281 conformers are concerned, only the model **2c_B** has a planar conformation.

282

Formula				
Code	2c	2c_C	2c_A	2c_B
E_h (kJ/mol)	-2303487.47	-2303457.60	-2303476.49	-2303476.73
λ (Å)	1.64684 2.13788	2.06871 2.18585	2.01384 1.92950	2.02460 1.97948 2.23725

283

284 **Table 8.** A comparison of three conformers of compound **2c**, their calculated total energy E_h
 285 and the length λ of the possible hydrogen bond(s) (the upper bond in the formula is given
 286 first).

287

288

Conclusions

289

290 In conclusion, *N*-(2-pyridylmethyl)salicylamides show better solubility in medium
 291 than *N*-benzylsalicylamides and show a better activity than *N*-(3-pyridylmethyl)salicylamides.
 292 The QSAR calculations showed that their antimycobacterial activity increases with their
 293 lipophilicity. The lipophilicity parameter might be used as a predictive indicator for the
 294 biological activity of new compounds in these series. As lipophilicity can be measured by thin
 295 layer chromatography on silica gel impregnated with trioctadecylsilane, this would be a very
 296 simple and quick test for new compounds. 3D models were created for compounds **2d** and **3d**.
 297 The molecules **2c** and **2d** were further studied to find the possible interactions.

298

299 *Acknowledgements.* This study is part of research project number MSM0021620822 of
 300 *Ministry of Education of the Czech Republic.*

301

302

Symbols

303

304 *14/21d* 14/21 days incubation

305 *DMSO* Dimethylsulfoxide

306 *F* Fischer-Snedecor F-test

307 *I* Indicator parameter

308 *log P* partition coefficient (octanol-water)

309 *MIC* minimum inhibitory concentration (μM)

310 *n* number of compounds used for the calculation

311 *QSAR* quantitative structure-activity relationship

312 *R* correlation coefficient

313 *R_M* retention data, calculated by means of the formula $R_M = \log(1/R_F - 1)$

314 *s* standard deviation

315 *TLC* thin layer chromatography

316

317

References

318

319 Bayer Aktiengesellschaft (1975), Germ. Offen. 2417763.

320 Hlasta, D. J., Demers, J. P., Foleno, B. D., Frago-Spano, S. A., Guan, J., Hilliar, J. J., Macielag,
321 M. J., Ohemeng, K. A., Sheppard, Ch. M., Sui, Z., Webb, G. C., Weidner-Well, M. A.,
322 Werblood, H., Barren, J. F. (1998). Novel inhibitors of bacterial two-component systems
323 with gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening
324 hit closantel. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8, 1923-1938. doi:
325 10.1016/S0960-894X(98)00326-6.

326 Kaliszan, R.: Quantitative structure-chromatographic retention (1987), John Wiley, New
327 York, 232-278.

328 Macielag, M. J., Demers, J. P., Fraga-Spano, S. A., Hlasta, D. J., Johnson, S. G., Kanojia, R.
329 M., Russell, R. K., Sui, Z., Weidner-Wells, M. A., Werblood, H., Foleno, B. D.,
330 Goldschmidt, R. M., Loeloff, M. J., Webb, G. C., Barrett, J. F. (1998). Substituted
331 salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *Journal of*
332 *Medicinal Chemistry*, 41, 2939-2943. doi: 10.1021/jm9803572.

333 Nemecek, P., Ďurčková, T., Mocák, J., Waisser, K. (2009). Chemometrical analysis of
334 computed QSAR parameters and their use in biological activity prediction. *Chemical*
335 *Papers*, 63, 84-91. doi:10.2478/s11696-008-0089-9.

336 Organic Syntheses, Coll. Vol. 4, pp.178-179 (1963); Vol. 32, p.25 (1952). Retrieved from:
337 http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp_form_group&dataaction=db
338 [&dbname=orgsyn.](http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp_form_group&dataaction=db)

339 Organic Syntheses, Coll. Vol. 3, p.765 (1955); Vol. 26, p.92 (1946). Retrieved from:
340 http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp_form_group&dataaction=db
341 [&dbname=orgsyn.](http://www.orgsyn.org/orgsyn/default.asp?formgroup=basenp_form_group&dataaction=db)

342 Revathi, A., G., Gupta, A. K., Soni, L. K., Kaskhedikar, S. G. (2009). Study of
343 physiochemical properties-antitubercular activity relationship of naphthalene-1,4-dione
344 analogs: A QSAR approach. *Chemical Papers*, 63, 723-730. doi:10.2478/s11696-009-0080-
345 0.

346 Waisser, K., Bureš, O., Holý, P., Kuneš, J., Oswald, R., Jirásková, L., Pour, M., Klimešová,
347 V., Kubicová, L., Kaustová, J. (2003). Relationships between structure and
348 antimycobacterial activity of substituted salicylanilides. *Archiv der Pharmazie* 336, 53-71
349 (a). doi: 10.1002/ardp.200390004.

350 Waisser, K., Hladůvková, J., Kuneš, J., Kubicová, L., Klimešová, V., Karajannis, P.,
351 Kaustová, J. (2001). Synthesis and antimycobacterial activity of salicylanilides substituted in
352 position 5. *Chemical Papers*, 55, 121-129.

353 Waisser, K., Peřina, M., Klimešová, V., Kaustová, J.: On the relationship between the
354 structure and antimycobacterial activity substituted *N*-benzylsalicylamides. (2003).
355 *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 68, 1275-1294 (b).
356 doi:10.1135/cccc20031275.

357 WHO Report 2009. Retrieved from:
358 http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html
359
360
361

WAISSER, K., PETRLÍKOVÁ, E., KUNEŠ, J.,
VRABCOVÁ, P., KOLÁŘ, K., STOLAŘÍKOVÁ J.: The
Antimycobacterial Salicylanilides, Inhibitors of ATP Synthesis.
Folia Pharm. Univ. Carol. accepted.

The antimycobacterial salicylanilides, inhibitors of ATP synthesis

Karel Waisser¹, Eva Petrlíková¹, Jiří Kuneš¹, Petra Vrabcová², Karel Kolář², Jiřina Stolaříková³

¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic

² Department of chemistry, University of Hradec Králové, Hradec Králové

³ Regional Institute of Public Health, Partyzánské náměstí 7, CZ-70200 Ostrava, Czech Republic

e-mail: waisser@faf.cuni.cz

Abstract

On the basis of our previous results, 18 salicylanilides were synthesized. The compounds were tested for the *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* and two strains of *Mycobacterium kansasii*. The new compounds are mainly active against INH-resistant strains of *M. kansasii* and *M. avium*. The activity against *M. tuberculosis* is lower than that of INH. The 5'-butyl-5-chlorosalicylanilide is the most active derivative of the newly prepared compounds.

Keywords: anilides - thioxo group – tuberculostatics - antimycobacteriens

Introduction

The return of tuberculosis to Europe and North America is one of the features of the period dating from 1985. The new mycobacterial diseases have occurred that have been recently considered intransferable to humans (mycobacterioses produced by potentially pathogenic strains). The development of new antituberculous agents is the principal goal of our research group. We have published a study of substituted salicylanilides as potential antituberculous with a new mechanism of action, different from the drugs already in use²⁻⁴. According to our study, we suppose that the substitution of *N*-phenylsalicylanilides in position 4' by alkyls decreases the antimycobacterial activity. The salicylic moiety was substituted with fluorine, chlorine, bromine and a methyl group. The goal of this paper is the synthesis and antimycobacterial evaluation of new compounds. The paper has completed our previous study⁴. According to our previous paper, 4'-Alkylsalicylanilides are the inhibitors of ATP biosynthesis which is a very important mechanism of action.

Experimental

Chemistry

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm^{-1} . The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H - and 75 MHz for ^{13}C -NMR in d_6 -DMSO (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were recorded as δ values in ppm, and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for ^1H - and 77.0 for ^{13}C -NMR). The coupling constants J are given in Hz. Elemental analyses were performed on a CHNS-O CE elemental analyzer (FISONS EA1110, Milano). Analyses of the C, H, N, S contents were within 0.4% of the theoretical values. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane/acetone 3: 1, to check the purity of the products.

General procedure for the preparation of N-(4-alkylphenyl)salicylanilides

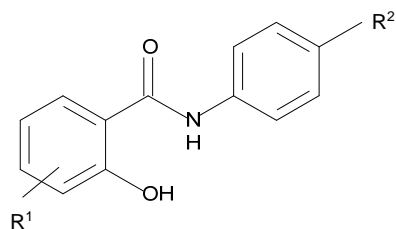
A suspension of substituted salicylic acid (0.02 mol) and substituted aniline (0.02 mol) in toluene (100 mL) was heated under reflux in the presence of PCl_3 (0.01 mol) for three hours. The reaction mixture was filtered while hot, and the solvents were evaporated. The product was crystallized from ethanol-water (yields in the range 52-79%). The structure is summarized in Table 1, the melting points and $\nu(\text{C}=\text{O})$ are summarized in Table 2, the NMR spectra are summarized in Table 3.

Microbiology

Newly synthesized derivatives of substituted *N*-(4-alkylphenyl)salicylanilides were used for the biological evaluations. The *in-vitro* antimycobacterial activity of the compounds was investigated against *M. tuberculosis* CNCTC My 331/ 88 (identical with H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/ 80 (identical with ATCC 12 478, resistant to INH), *M. avium* CNCTC My 330/ 88 (identical with ATCC 25291, resistant to INH). The standard strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague. The strain *M. kansasii* 6509/ 96 was clinically isolated. The dilution-micro-method was used for the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and the MIC values for the standard isoniazid (INH) were included for

the sake of comparison. The overview of the antimycobacterial activity together with the activity of INH is summarized in Table 1. The antimycobacterial activity was in the range from 8 to 62.5 $\mu\text{mol/l}$, so this activity is better than or comparable to that of INH. Only in the case of *M. tuberculosis* and *M. kansasii* 6509/96, these derivatives are less active than INH.

Table 1. Structure and antimycobacterial activity in $\mu\text{mol/l}$ of substituted *N*-(4-alkylphenyl)salicylanilides (incubation 14d/21d).



Comp.	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
1	5-Br	ethyl	16/32	62.5/62.5	16/62.5	32/62.5
2	5-Cl	ethyl	8/8	n/n	8/8	16/16
3	4-Cl	ethyl	8/8	16/16	8/16	16/16
4	5-Br	isopropyl	8/8	16/32	16/16	16/16
5	5-Cl	isopropyl	8/8	16/32	16/16	16/16
6	4-Cl	isopropyl	8/8	8/16	8/16	16/16
7	5-F	isopropyl	8/32	8/32	16/16	16/16
8	4-CH ₃	isopropyl	n/n	n/n	n/n	n/n
9	5-Br	<i>sec</i> -butyl	4/8	16/16	16/16	16/16
10	5-Cl	<i>sec</i> -butyl	8/8	16/16	16/16	16/16
11	4-Cl	<i>sec</i> -butyl	8/8	8/8	16/16	16/16
12	5-F	<i>sec</i> -butyl	8/8	8/8	8/16	8/16
13	4-CH ₃	<i>sec</i> -butyl	n/n	n/n	n/n	n/n
14	5-Cl	butyl	4/4	8/8	8/8	4/8
15	5-Cl	<i>tert</i> -butyl	8/16	16/32	16/16	16/16
16	4-Cl	<i>tert</i> -butyl	16/16	n/n	32/62.5	32/62.5
17	5-F	<i>tert</i> -butyl	8/8	8/16	16/16	8/16
18	4-CH ₃	<i>tert</i> -butyl	n/n	n/n	n/n	n/n
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

Table 2. The melting point and frequency of the carbonyl group of new compounds.

Compounds	Melting point (°C)	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})	Compounds	Melting point (°C)	$\nu(\text{C=O})$ (cm^{-1})
1	208-210	1629	10⁶	157-159	1621
2	198-201	1621	11⁷	200-205	1621
3⁵	198-200	1622	12	157-160	1621
4	197-198	1621	13	155-158	1619
5	181-185	1620	14	162-163	1628
6	218-219	1616	15	221-222	1627
7	173-175	1623	16	232-233	1623
8	183-184	1620	17	184	1624
9	163-165	1621	18	208-210	1618

Compounds **3**, **10** and **11** have already been described.

Table 3. NMR spectra.

Compound **NMR data**

- 1** ¹H NMR (300 MHz) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.09 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.62-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.57 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.16 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz) δ 165.1, 157.8, 140.1, 136.1, 135.8, 131.3, 128.2, 121.2, 119.9, 119.8, 110.3, 27.9, 15.9..
- 2** ¹H NMR (300 MHz) δ 11.95 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.58 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.16 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz) δ 165.2, 157.3, 140.1, 135.8, 133.3, 128.4, 128.2, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 27.8, 15.9.
- 3** ¹H NMR (300 MHz) δ 12.22 (1H, bs, NH), 10.31 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.62-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.22-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.57 (2H, q, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.16 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz) δ 165.7, 159.4, 140.0, 137.6, 135.8, 130.9, 128.2, 121.2, 119.4, 117.0, 27.8, 15.9.

- 4 ^1H NMR (300 MHz) δ 11.98 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.28-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.8, 144.7, 136.1, 135.8, 131.3, 126.7, 121.2, 119.9, 119.8, 110.3, 33.1, 24.1.
- 5 ^1H NMR (300 MHz) δ 11.96 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.64-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.27-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 144.8, 135.8, 133.3, 128.4, 126.7, 122.9, 121.2, 119.3, 33.1, 24.1.
- 6 ^1H NMR (300 MHz) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.08-6.98 (2H, m, H3, H5), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.18 (6H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 144.7, 137.6, 135.9, 130.9, 126.7, 121.2, 119.4, 117.0, 33.1, 24.1.
- 7 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.74 (1H, bs, NH), 10.34 (1H, bs, OH), 7.77 (1H, dd, $J=9.4$ Hz, $J=3.0$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.35-7.25 (1H, m, H4), 7.26-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.99 (1H, dd, $J=9.4$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3), 2.95-2.79 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2 (d, $J=2.3$ Hz), 155.0 (d, $J=234.8$ Hz), 154.8, 144.7, 135.8, 126.7, 121.2, 120.7 (d, $J=23.5$ Hz), 118.8 (d, $J=7.5$ Hz), 118.3 (d, $J=6.6$ Hz), 114.8 (d, $J=24.3$ Hz), 33.1, 24.1.
- 8 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.06 (1H, bs, NH), 10.26 (1H, bs, OH), 7.91 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.62-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.80-6.74 (2H, m, H3, H5), 2.93-2.78 (1H, m, CH), 2.29 (3H, s, CH₃), 1.19 (6H, d, $J=7.2$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.2, 159.5, 144.6, 136.0, 128.8, 126.6, 121.5, 120.2, 117.7, 114.0, 33.1, 24.1, 21.3.
- 9 ^1H NMR (300 MHz) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.22-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.63-2.51 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1,

157.8, 143.4, 136.1, 135.9, 131.3, 127.3, 121.2, 120.0, 119.7, 110.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3.

10 ^1H NMR (300 MHz) δ 11.87 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.64-2.51 (1H, m, CH), 1.61-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 143.5, 135.9, 133.3, 128.5, 127.3, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3..

11 ^1H NMR (300 MHz) δ 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.64-2.50 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 143.4, 137.6, 135.9, 130.9, 127.3, 121.2, 119.3, 117.1, 117.0, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3.

12 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.72 (1H, bs, NH), 10.34 (1H, bs, OH), 7.77 (1H, dd, $J=9.1$ Hz, $J=3.3$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30 (1H, dt, $J=9.1$ Hz, $J=3.3$ Hz, H4), 7.23-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.99 (1H, dd, $J=9.1$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3), 2.66-2.51 (1H, m, CH), 1.63-1.45 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.76 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2 (d, $J=2.3$ Hz), 155.0 (d, $J=234.8$ Hz), 154.8, 143.4, 135.9, 127.3, 121.2, 120.7 (d, $J=23.2$ Hz), 118.8 (d, $J=7.5$ Hz), 118.4 (d, $J=6.9$ Hz), 114.8 (d, $J=24.3$ Hz), 40.6, 30.8, 22.0, 12.2.

13 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.04 (1H, bs, NH), 10.26 (1H, bs, OH), 7.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.63-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.21-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.81-6.74 (2H, m, H3, H5), 2.63-2.51 (1H, m, CH), 2.29 (3H, s, CH₃), 1.63-1.44 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.1, 159.5, 144.5, 143.3, 136.0, 128.8, 127.2, 121.4, 120.2, 117.7, 114.1, 40.6, 30.8, 22.0, 21.3, 12.3..

14 ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.93 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, s, OH), 7.97 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.61-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.22-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.54 (2H, t, $J=7.4$ Hz, CH₂), 1.60-1.45 (2H, m, CH₂), 1.36-1.21 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, $J=7.4$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 138.7, 135.8, 133.3, 128.7, 128.5, 122.9, 121.1, 119.5, 119.3, 34.5, 33.4, 21.9, 14.0..

- 15** ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.37 (1H, s, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.9$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H3), 1.27 (9H, s, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 147.0, 135.6, 133.3, 128.5, 125.6, 122.9, 120.9, 119.4, 34.3, 31.4.
- 16** ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.33 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, $J=9.1$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-7.00 (2H, m, H3, H5), 1.27 (9H, s, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 146.9, 137.6, 135.6, 130.9, 125.6, 120.9, 119.4, 117.1, 34.3, 31.4.
- 17** ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.75 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.78 (1H, dd, $J=9.3$ Hz, $J=3.2$ Hz, H6), 7.64-7.57 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.42-7.35 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.30 (1H, dt, $J=9.3$ Hz, $J=3.2$ Hz, H4), 6.99 (1H, dd, $J=9.3$ Hz, $J=4.7$ Hz, H3), 1.27 (9H, s, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.3 (d, $J=2.3$ Hz), 155.0 (d, $J=235.0$ Hz), 154.8, 147.0, 135.5, 125.6, 120.7 (d, $J=24.2$ Hz), 118.8 (d, $J=7.5$ Hz), 118.3 (d, $J=6.9$ Hz), 114.8 (d, $J=24.8$ Hz), 34.3, 31.3..
- 18** ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.06 (1H, bs, NH), 10.26 (1H, bs, OH), 7.91 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.81-6.75 (2H, m, H3, H5), 2.29 (3H, s, CH₃), 1.27 (9H, s, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.2, 159.5, 146.8, 144.6, 135.7, 128.8, 125.5, 121.1, 120.2, 117.7, 114.0, 34.3, 31.4, 21.3.

Results and Discussion

The identification of the structure of the new compounds was made by means of the IR and NMR spectra. The studied compounds are active against all strains of the mycobacterium under study. The antimycobacterial activity was in the range from 4 to 62.5 $\mu\text{mol/L}$ (mainly 8 $\mu\text{mol/L}$ against *M. tuberculosis* and 16 $\mu\text{mol/L}$ against the potentially pathological strains). The compounds are active against INH-resistant strains. These derivatives were less active than INH in the case of the strains of *M. tuberculosis* and *M. kansasii* 6509/96. As reported in our previous paper⁴ 4'-butyl-4-chlorsalicylanilide and 5'-octyl-5-bromsalicylanilide were almost as active as INH against *M. tuberculosis* and *M. kansasii* 6509/96. The present study has completed the results about the activity of 4'-alkylsalicylanilides. 5'-Butyl-5-chlorsalicylanilide (**14**) is the most active derivative of the newly prepared compounds. On the basis of our previous paper⁴, we suppose that the new compounds are potential inhibitors of

ATP synthesis. Some parts of compounds are described but their documentation is very poor. It seems that the compounds deserve chemical interest.

Acknowledgements

This work is a part of the research project No. MSM 0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

References

1. Macielag, M. J., Demers, J. P., Fraga-Spano, S. A., Hlasta, D. J., Johnson, S. G., Kanojia, R. M., Russel, R. K., Sui, Z., Weidner-Wells, M. A., Werblood, H., Foleno, B. D., Goldschmidt, R. M., Loeloff, M. J., Webb, G. C., Barrett, J. F.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.*, 41, 2939-2945 (1998).
2. Lin Guo, Wang, Q.-L., Jiang, Q.-Q., Jiang, Q.-J., Jiang Y.-B.: Anion-triggered substituent-dependent conformational switching of salicylanilides. New hints for understanding the inhibitory mechanism of salicylanilides. *J. Org. Chem.* 72, 2007, 9947-9953.
3. Hlasta, D. J., Demers, J. P., Foleno, B. D., Fraga-Spano, S. A., Guan, J., Hilliard, M. J., Macielang, M. J., Ohemeng, K. A., Sheppard, Ch. M., Sui, Z., Webb, G. C., Weidner-Wells, M. A., Werblood, H., Barrett, J. F.: Novel inhibitors of bacterial two-component systems with Gram positive antibacterial activity: Pharmacophore identification based on the screening hit closantel. *Bioorg Med Chem Lett.*, 8, 1998, 1923-1928.
4. Waisser, K., Matyk, J., Divišová, H., Husáková, P., Kuneš, J., Klimešová, V., Kaustová, J., Möllmann, J., Dahse, H.-M., Miko, M.: The oriented development of antituberculotics. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 339, 2006, 616-620.
5. Kuhnt, D.; Jelich, Kl.; Haug, M.; Stenzel, K.; Dehne, H.-W.; Erdelen, Ch.: Preparation of 4-chlorbenzamides as pesticides. *Ger. Offen.* (1996), 17 pp. CODEN: GWXXBX DE 4428381 A1 19960215 CAN 124:289012 AN 1996: 262047.
6. Muto, S.; Itai, A. Preparation of phenol or phenyl acetate derivatives as inhibitors against the activation of activator protein-1 (AP-1) and nuclear factor of activated T-

cells (NFAT). PCT Int. Appl. (2003), 401 pp. CODEN: PIXXD2 WO 2003103647
A1 20031218 CAN 140:27849 AN 2003:991329.

7. Chen, J., Dixon, B. R.; Dumas, J.; Brittelli, D.: Protocols for amide high-speed analoging. Preparation of novel, small molecule cathepsin D inhibitors. Tetrahedron Letters, 40(52), 1999, 9195-9199.

PETRLÍKOVÁ E., WAISSER, K., DIVIŠOVÁ, H.,
HUSÁKOVÁ, P., VRABCOVÁ, P., KUNEŠ, J., KOLÁŘ, K.
STOLAŘÍKOVÁ, J.: Highly Active Antimycobacterial
Derivatives of Benzoxazine. *Bioorg. Med. Chem.*, under review.

Highly Active Antimycobacterial Derivatives of Benzoxazine

Eva Petrlíková^{a*}, Karel Waisser^a, Hana Divišová^a, Petra Husáková^a, Petra Vrabcová^b, Jiří Kuneš^a, Karel Kolář^b, Jiřina Stolaříková^c

^a *Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

^b *Department of Chemistry, University of Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic*

^c *Regional Institute of Public Health, Partyzánské náměstí 7, Ostrava, Czech Republic*

*Corresponding author: Phone: +420495067335. Fax: +420465067166.

E-mail: Eva.Petrlikova@faf.cuni.cz

Abstract

New 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were synthesized. The compounds were tested for *in-vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* and two strains of *M. kansasii*. The antimycobacterial activity increased with the replacement of the carbonyl group by the thiocarbonyl group in the starting 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. The most active derivatives were more active than isonicotinhydrazide (INH). Free-Wilson analysis was also carried out and the activity contribution was examined.

Keywords: Benzoxazine, Thioxo group, Antimycobacterial activity, Tuberculosis

1. Introduction

Tuberculosis is an infectious bacterial disease that can be transmitted from person to person because of the droplets from the throat and lungs of people suffering from the active respiratory disease. Tuberculosis was always a serious problem in developing countries and the multidrug resistant strains of *M. tuberculosis* are transferred by the migration of a population to Europe and North America. More than two billion people (one third of the world's population) are, according to WHO, infected with TB bacilli, the microbes that cause tuberculosis.¹ WHO also estimated that 9.37 million incident cases of TB and 11.09 million prevalent cases of TB occurred in the year 2008. There were 1.32 million deaths from TB in the same year.² Hence, there is a great need to develop new drugs and found new strategies to control this outbreak of tuberculosis.

Many antituberculosis agents containing a thioxo group were important in the history of antituberculosis drugs. For example, p-acetamidobenzaldehyde thiosemicarbazone (Thiacetazone), 4, 4'-bis(isopentoxy)thiocarbanilide (Isoxyl), or 2-ethylpyridine-4-carbotioamide (Ethionamide) are known to inhibit the mycolic acids biosynthesis.³⁻⁵

This study is oriented on the derivatives of benzoxazinediones in which one or both oxo groups were replaced by the thioxo group. Since the compounds are cyclic derivatives of salicylanilides it can be supposed that they can serve as bacterial two-component system inhibitors.^{6,7} This type of mechanism of action is very promising while such a type of the antibacterial effect is probably different from the effect of other antibacterial drugs.

2. Chemistry

The starting 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones were prepared by the reaction of *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides with methyl chloroformate in dry pyridine and purified by crystallization from ethanol. 3-(4-Alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were synthesized by the treatment of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones with phosphorus pentasulfide. The structural assignment is based on ¹H-NMR, ¹³C-NMR and IR spectra. The purity of the compounds was confirmed by means of elemental analysis. An overview of the

synthesis is in Scheme 1. The structures of the prepared compounds are summarized in Tables 1-3.

Scheme 1

Table 1

Table 2

Table 3

3. Antimycobacterial Activity

The *in-vitro* antimycobacterial activity of the compounds was investigated against *M. tuberculosis* CNCTC My 331/ 88 (identical with H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/ 80 (identical with ATCC 12 478, resistant to INH), *M. avium* CNCTC My 330/ 88 (identical with ATCC 25291, resistant to INH) and *M. kansasii* 6509/96. All the strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague. The only exception is *M. kansasii* 6 509/ 96 that was clinically isolated and that is in contrast to the standard strain not resistant to isoniazid (INH). The dilution micromethod was used for the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and the MIC values for the standard INH were included for the sake of comparison. The overview of the biological activity together with the activity of INH is shown in Tables 1-3. The MIC values of compounds 1a, 1c, 1f, 1k, 1o, 1p and 1q were taken from our previous papers^{8, 9, 10} to complete the evaluation and to compare with the biological activity.

The antimycobacterial activity of the starting 3-benzyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones is in the range of 4-16 $\mu\text{mol/L}$. The replacement of one oxo group with a thioxo group strongly increases the antimycobacterial activity. The additional replacement has a small effect on the activity. Figure 1 shows such an increase in the activity in the case of *M. tuberculosis*. The MIC values of the sulfur compounds are generally within the range of 0.25-125 $\mu\text{mol/L}$ but the majority of MICs is in the range of 0.25-8 $\mu\text{mol/L}$. All the sulfur derivatives are more active than INH.

Figure 1

4. Free-Wilson analysis

The Free-Wilson method with the Fujita-Ban modification was used to investigate the activity contribution in the case of sulfur derivatives. All the calculations were carried out using the Multireg program for Microsoft Excel. Since the MIC values after 14d and 21d incubation correlated with each other, only the MICs after 14d evaluation were taken for the calculations. The MICs of sulfur derivatives of 6-bromo-3-(4-propylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione, 6-bromo-3-(4-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione and 7-chloro-3-(4-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione were taken from the literature¹¹ and used for the calculation. Chlorine as the R¹ substituent at the position 7 on the benzoxazine ring and propyl as the R² substituent were used as the standards. The results show that the biological activity increases with the fluorine or methyl moiety as the R¹ substituents. The increase in activity is also connected with the branched R² substituents.

Table 4

Table 5

5. Conclusion

The replacement of the carbonyl group by the thiocarbonyl group in 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones increases the antimycobacterial activity. The derivatives of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones (**2a-2s**) and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones (**3a-3s**) possess a better biological activity than INH, the standard used for the sake of comparison. An advantage is the presumption that these compounds can be of different mechanisms of action from the antituberculosis drugs already in use. (4-*Sec*-butylphenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (**2n**) seems to be the most prospective compound as it shows the best activity against all mycobacterial strains under tests. This compound has been selected for future investigation.

6. Experimental protocols

6.1. Chemistry, general information

The melting points were determined on a Kofler apparatus. The samples for the analyses and antimycobacterial tests were dried over P₂O₅ at 61 °C and 66 Pa for 24 h. Elemental analyses (C, H, N) were performed on a CHNS-O CE elemental analyzer (Fisions EA 1110, Milan) and were within ±0.4 % of the theoretical values. The IR spectra were measured in KBr pellets on a Nicolet Impact 400 apparatus; the wavenumbers are given in cm⁻¹. TLC was

performed on silica gel plates precoated with the fluorescent indicator Silufol UV 254 + 366 (Kavalier Votice, Czech Republic), hexane-acetone (3:1) was used as the mobile phase. Crystallization of products was carried out from ethanol. The ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of new compounds were recorded in $\text{DMSO-}d_6$ solutions at ambient temperature on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H NMR, and 75 MHz for ^{13}C NMR. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane *via* the solvent signal (2.49 for ^1H or 39.7 for ^{13}C).

6.2 Chemistry, synthetic procedures to preparation of 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones (1b, 1d, 1e, 1g, 1h-1j, 1l-1n, 1r, 1s).

Methyl chloroformate (5.2g, 48 mmol) was added dropwise to a stirred solution of the corresponding salicylanilide (40 mmol) in dry pyridine (20mL) under ice cooling. The mixture was heated on a steam bath for 1 hour and then poured into 5% hydrochloric acid (140mL). After 24 h the product was filtered off, suspended in 5% sodium carbonate solution and the solid was filtered off. The crude product was purified by crystallization from ethanol.

6.2.1 6-Bromo-3-(4-ethylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1b), white solid, yield 59%, mp 219-222°C, IR (ν CO) 1772,1703 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.97 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH_2), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 147.5, 144.7, 138.9, 132.8, 129.5, 128.6, 128.4, 119.2, 117.1, 117.0, 28.1, 15.7; Anal calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_3$ (346.18): C 55.51; H 3.49; N 4.05. Found: C 55.67; H 3.55; N 3.80.

6.2.2 7-Chloro-3-(4-ethylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1d), white solid, yield 58%, mp 185-189°C, IR (ν CO) 1776,1708 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5), 7.75 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH_2), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 147.6, 144.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.6, 128.5, 125.8, 116.8, 114.2, 28.1, 15.7; Anal calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$ (301.73): C 63.69; H 4.01; N 4.46. Found: C 63.59; H 3.95; N 4.36.

6.2.3 6-Bromo-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1e), white solid, yield 72%, mp 174-177°C, IR (ν CO) 1763,1703 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.08-7.97 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.41-7.34 (2H, m, AA', BB',

- H2', H6'), 7.34-7.26 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.05-2.85 (1H, CH), 1.24 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 149.2, 147.5, 138.9, 132.8, 129.5, 128.4, 127.1, 119.2, 117.1, 117.0, 33.4, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄BrNO₃ (360.2): C 56.69; H 3.92; N 3.89. Found: C 56.47; H 3.97; N 3.80.
- 6.2.4 7-Chloro-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1g)**, white solid, yield 61%, mp 180-183°C, IR (ν CO) 1770,1704 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.41-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 3.04-2.88 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 149.2, 147.6, 140.5, 132.8, 129.3, 128.5, 127.1, 125.8, 116.8, 114.2, 33.4, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄ClNO₃ (315.76): C 64.67; H 4.47; N 4.44. Found: C 64.62; H 4.43; N 4.20.
- 6.2.5 6-Fluoro-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1h)**, white solid, yield 60%, mp 193-194°C, IR (ν CO) 1770,1700 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.79-7.69 (2H, m, H5, H7), 7.62-7.54 (1H, m, H8), 7.41-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.34-7.28 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.87 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); Anal calc. for C₁₇H₁₄FNO₃ (299.3): C 68.22; H 4.71; N 4.68. Found: C 68.03; H 4.71; N 4.55.
- 6.2.6 3-(4-Isopropylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1i)**, white solid, yield 67%, mp 212-213°C, IR (ν CO) 1764,1689 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.86 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H5), 7.41-7.24 (6H, m, H6, H8, H2', H3', H5', H6'), 3.05-2.87 (1H, m, CH), 2.46 (3H, s, CH₃), 1.25 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.8 152.7, 149.0, 148.0, 147.8, 133.0, 128.6, 127.4, 127.0, 126.5, 116.4, 112.4, 33.4, 24.0, 21.5; Anal calc. for C₁₈H₁₇NO₃ (295.34): C 73.20; H 5.80; N 4.74. Found: C 72.81; H 5.80; N 4.57.
- 6.2.7 6-Bromo-3-(4-sec-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione (1j)**, white solid, yield 64%, mp 208-209°C, IR (ν CO) 1770,1703 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.98 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.37-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.75-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.52 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 148.0, 147.5, 138.9, 132.8, 129.4, 128.4, 127.7, 119.2, 117.1, 117.0, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆BrNO₃ (374.24): C 57.77; H 4.31; N 3.74. Found: C 57.54; H 4.27; N 3.50.

- 6.2.8 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1l)**, white solid, yield 70%, mp 136-137°C, IR (ν CO) 1776,1696 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5), 7.75 (1H, d, *J*=1.9 Hz, H8), 7.52 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, *J*=1.9 Hz, H6), 7.37-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.74-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃), 0.81 (3H, t, *J*=7.1 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 148.0, 147.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.4, 127.7, 125.8, 116.8, 114.2, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₃ (329.79): C 65.56; H 4.89; N 4.25. Found: C 65.27; H 4.90; N 4.07.
- 6.2.9 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-6-fluoro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1m)**, white solid, yield 63%, mp 114-116°C, IR (ν CO) 1767,1734 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.82-7.68 (2H, m, H5, H7), 7.64-7.54 (1H, m, H8), 7.37-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.74-2.58 (1H, m, CH), 1.67-1.50 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₃), 0.81 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₃); Anal calc. for C₁₈H₁₆FNO₃ (313.3): C 69.00; H 5.15; N 4.47. Found: C 68.93; H 5.25; N 4.37.
- 6.2.10 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1n)**, white solid, yield 71%, mp 137-140°C, IR (ν CO) 1761,1694 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.86 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H5), 7.36-7.24 (6H, m, H6, H8, H2', H3', H5', H6'), 2.74-2.58 (1H, m, CH), 2.46 (3H, s, CH₃), 1.66-1.49 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃), 1.81 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.8, 152.8, 148.0, 147.8, 133.1, 128.6, 127.4, 127.2, 126.5, 116.5, 112.4, 40.8, 30.8, 22.0, 12.3; Anal calc. for C₁₉H₁₉NO₃ (309.37): C 73.77; H 6.19; N 4.53. Found: C 73.96; H 6.28; N 4.45.
- 6.2.11 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-6-fluoro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1r)**, white solid, yield 58%, mp 145-147°C, IR (ν CO) 1770,1733 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.80-7.68 (1H, m, H5), 7.64-7.53 (1H, m, H7), 7.55-7.48 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.42-7.35 (1H, m, H8), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); Anal calc. for C₁₈H₁₆FNO₃ (313.3): C 69.00; H 5.15; N 4.47. Found: C 68.90; H 5.21; N 4.39.
- 6.2.12 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione (1s)**, white solid, yield 70%, mp 170-172°C, IR (ν CO) 1753,1707 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.86 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H5), 7.55-7.47 (2H, m, H2', H6'), 7.35-7.24 (4H, m, H6, H8, H3', H5'), 2.46 (3H, s, CH₃), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.9,

152.8, 151.2, 148.1, 147.8, 132.8, 128.3, 127.5, 126.5, 126.0 116.5, 112.4, 34.7, 31.3, 21.6; Anal calc. for C₁₉H₁₉NO₃ (309.37): C 73.77; H 6.19; N 4.53. Found: C 73.49; H 6.17, N 4.36.

6.3 Chemistry, synthetic procedures for the preparation of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones (2a-2s) and 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones (3a-3s).

3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones (3.8 mmol) were melted with P₄S₁₀ (7.6 mmol) for 20 minutes (175-200°C). After cooling to the room temperature, a 10% potassium carbonate solution (60 mL) was poured into the reaction mixture; the crude product was filtered off, and dissolved in toluene (p.a., 40 mL). Column chromatography on silica gel yielded 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. The products were crystallized from ethanol.

6.3.1 6-Bromo-3-(4-methylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2a), yellow solid, yield 36%, mp 259-261°C; IR (ν CO) 1759 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (d, 1H, J=2.45 Hz, H5), 7.80 (dd, 1H, J=8.52 Hz, J=2.45 Hz, H7), 7.40-7.34 (m AA', BB', 2H, H2', H6'), 7.20 (d, 1H, J=8.52 Hz, H8), 7.16-7.11 (m AA', BB', 2H, H3', H5'), 2.45 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 190.0, 148.2, 144.6, 139.5, 138.4, 136.2, 134.3, 130.6, 127.3, 122.0, 118.8, 118.4, 21.5; Anal calc. for C₁₅H₁₀BrNO₂S (348.2): C 51.74; H 2.89; N 4.02; S 9.21. Found: C 51.22; H 2.62; N 3.98; S 9.11.

6.3.2 6-Bromo-3-(4-ethylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2b), yellow solid, yield 42%, mp 227-229°C, IR (ν CO) 1759 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, J=2.3 Hz, H5), 8.02 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.3 Hz, H7), 7.47 (1H, d, J=8.8 Hz, H8), 7.38-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, J=7.6 Hz, CH₂), 1.22 (3H, t, J=7.6 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 144.5, 138.6, 137.6, 133.0, 128.9, 128.0, 122.5, 119.4, 117.4, 28.1, 15.6; Anal calc. for C₁₆H₁₂BrNO₂S (361.0): C 52.05; H 3.34; N 3.87; S 8.85. Found: C 52.80; H 3.33; N 3.56; 8.73.

6.3.3 6-Chloro-3-(4-ethylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2c), yellow solid, yield 33%, mp 199-202°C, IR (ν CO) 1761 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, J=2.6 Hz, H5), 7.91 (1H, dd, J=8.8 Hz, J=2.6 Hz, H7), 7.55 (1H, d, J=8.8

- Hz, H8), 7.38-7.31 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.31-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 144.6, 144.5, 137.7, 135.8, 130.0, 129.7, 128.9, 128.0, 122.2, 119.2, 28.1, 15.6; Anal calc. for C₁₆H₁₂ClNO₂S (317.0): C 60.47; H 3.81; N 4.41; S 10.99. Found: C 60.39; H 3.84; N 4.31; S 11.28.
- 6.3.4 7-Chloro-3-(4-ethylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2d)**, yellow solid, yield 39%, mp 188-190°C, IR (ν CO) 1761 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.2$ Hz, H6), 7.38-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.23 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.53 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.9, 150.2, 144.5, 144.5, 140.7, 137.6, 133.0, 128.9, 128.1, 126.2, 120.1, 116.8, 28.1, 15.6; Anal calc. for C₁₆H₁₂ClNO₂S (317.0): C 60.47; H 3.81; N 4.41; S 10.99. Found: C 60.33; H 3.79; N 4.22; S 10.22.
- 6.3.5 6-Bromo-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2e)**, yellow solid, yield 26%, mp 199-201°C, IR (ν CO) 1759 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.01 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.42-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.32-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.87 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.3, 149.1, 149.0, 144.5, 138.6, 137.7, 133.0, 128.0, 127.4, 122.5, 119.4, 117.4, 33.4, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄BrNO₂S (376.27): C 54.27; H 3.75; N 3.72; S 8.52. Found: C 54.04; H 3.62; N 3.62; S 8.51.
- 6.3.6 6-Chloro-3-(4-isopropyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2f)**, yellow solid, yield 14%, mp 163-165°C, IR (ν CO) 1751 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H7), 7.54 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.41-7.35 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.31-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.86 (1H, CH), 1.24 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.0, 148.7, 144.6, 137.7, 135.8, 130.1, 129.7, 128.0, 127.4, 122.2, 119.2, 33.4, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄ClNO₂S (331.8): C 61.53; H 4.25; N 4.22; S: 9.66. Found: C 61.18; H 4.27; N 3.77; S: 10.05.
- 6.3.7 7-Chloro-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2g)**, yellow solid, yield 31%, mp 198-199°C, IR (ν CO) 1761 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.73 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$

Hz, $J=2.1$ Hz, H6), 7.46-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.03-2.87 (1H, m, CH), 1.24 (6H, t, $J=6.5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 192.3, 150.7, 149.5, 145.0, 141.2, 138.1, 133.5, 128.6, 127.9, 126.6, 120.6, 117.3, 33.9, 24.5; Anal calc. for C₁₇H₁₄ClNO₂S (331.8): C 61.54; H 4.25; N 4.22, S 9.66. Found: C 61.55; H 4.07; N 3.99, S 9.91.

6.3.8 6-Fluoro-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2h),

yellow solid, yield 58%, mp 197-200°C, IR (ν CO) 1749 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.97 (1H, dd, $J=9.1$ Hz, $J=2.9$ Hz, H5), 7.76 (1H, dt, $J=9.1$ Hz, $J=2.9$ Hz, H7), 7.57 (1H, dd, $J=9.1$ Hz, $J=4.7$ Hz, H8), 7.41-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.32-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.06-2.87 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, $J=7.0$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.7 (d, $J=2.9$ Hz), 158.8 (d, $J=242.5$ Hz), 149.0, 146.3 (d, $J=1.7$ Hz), 144.7, 137.8, 128.0, 127.4, 123.8 (d, $J=25.4$ Hz), 122.0 (d, $J=-9.2$ Hz), 119.3 (d, $J=8.0$ Hz), 116.2 (d, $J=26.5$ Hz), 33.4, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄FNO₂S (315.4): C 64.75; H 4.47; N 4.44; S: 10.17. Found: C 64.74; H 4.66; N 4.27; S: 9.78.

6.3.9 3-(4-Isopropylphenyl)-7-methyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2i),

yellow solid, yield 20%, mp 203-207°C, IR (ν CO) 1746 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.17 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H5), 7.41-7.22 (6H, m, H6, H8, H2', H3', H5', H6'), 3.03-2.87 (1H, m, CH), 2.44 (3H, s, CH₃), 1.24 (6H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 192.6, 149.8, 148.8, 148.1, 145.0, 137.8, 131.4, 128.2, 127.3, 127.0, 118.9, 116.4, 33.4, 24.0, 21.5; Anal calc. for C₁₈H₁₇NO₂S (311.4): C 69.43; H 5.50; N 4.50; S 10.30. Found: C 69.06; H 5.41; N 4.54; S 10.50.

6.3.10 6-Bromo-3-(4-sec-butylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2j),

yellow solid, yield 24%, mp 189-190°C, IR (ν CO) 1756 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.59 (1H, m, CH), 1.65-1.51 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 0.80 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 147.9, 144.5, 138.6, 137.7, 133.0, 128.0, 122.5, 119.4, 117.4, 40.8, 30.7, 21.7, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆BrNO₂S (390.30): C 55.39; H 4.13; N 3.59, S 8.22. Found: C 55.08; H 4.15; N 3.44, S 8.43.

6.3.11 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-6-chloro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (2k)

yellow solid, yield 32%, mp 154-155°C, IR (ν CO) 1759 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 7.91 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.54 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.74-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₃), 0.80 (3H, t, *J*=7.2 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 147.9, 144.6, 137.7, 135.8, 130.0, 129.7, 128.0, 122.2, 119.2, 40.8, 30.8, 21.7, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₂S (345.85): C 62.51; H 4.66; N 4.05, S 9.27. Found: C 62.29; H 4.64; N 3.92, S 9.47.

6.3.12 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-chloro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (2l)

yellow solid, yield 18%, mp 114-116°C, IR (ν CO) 1751 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H5), 7.74 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H8), 7.51 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.3 Hz, H6), 7.36-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.74-2.58 (1H, m, CH), 1.69-1.49 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃), 0.80 (3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.8, 150.2, 147.8, 144.5, 140.7, 137.7, 133.0, 128.0, 127.9, 126.1, 120.1, 116.8, 40.8, 30.7, 21.7, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₂S (345.8): C 62.51; H 4.66; N 4.05; S: 9.27. Found: C 62.12; H 4.92; N 3.82; S: 9.25.

6.3.13 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-6-fluoro-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (2m)

yellow solid, yield 42%, mp 141-142°C, IR (ν CO) 1753 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.97 (1H, dd, *J*=9.4 Hz, *J*=2.9 Hz, H5), 7.80-7.72 (1H, m, H7), 7.57 (1H, dd, *J*=9.4 Hz, *J*=4.7 Hz, H8), 7.37-7.31 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.31-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.75-2.58 (1H, m, CH), 1.68-1.50 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=6.8 Hz, CH₃), 0.80 (3H, d, *J*=6.8 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.7 (d, *J*=3.5 Hz), 158.8 (d, *J*=242.5 Hz), 147.8, 146.3, 146.3, 144.7, 137.8, 128.0, 123.7 (d, *J*=25.3 Hz), 122.0 (d, *J*=8.6 Hz), 119.3 (d, *J*=8.0 Hz), 116.2 (d, *J*=26.5 Hz), 40.7, 30.7, 21.6, 12.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆FNO₂S (329.4): C 65.63; H 4.90; N 4.25; S: 9.73. Found: C 65.42; H 4.91; N 4.07; S: 9.43.

6.3.14 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (2n)

yellow solid, yield 9%, mp 179-182°C, IR (ν CO) 1749 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.18 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5), 7.35-7.22 (6H, m, H6, H8, H2', H3', H5', H6'), 2.72-2.59 (1H, m, CH), 2.44 (3H, s, CH₃), 1.66-1.49 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.2

Hz, CH₃), 0.81 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 192.6, 149.8, 148.1, 147.6, 145.0, 137.8, 131.4, 128.2, 127.8, 127.0, 118.9, 116.4, 40.7, 30.7, 21.7, 21.4, 12.3; Anal calc. for C₁₉H₁₉NO₂S (325.43): C 70.13; H 5.88; N 4.30; S 9.85. Found: C 69.79; H 5.96; N 4.22; S 9.50.

6.3.15 3-(4-Butylphenyl)-6-chloro-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2o), yellow solid, yield 29%, mp 149-152°C, IR (ν CO) 1771 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.29-7.22 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, $J=7.5$ Hz, CH₂), 1.67-1.52 (2H, m, CH₂), 1.42-1.26 (2H, m, CH₂), 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 144.5, 143.2, 137.6, 135.8, 13.0, 129.7, 129.4, 127.9, 122.2, 119.2, 34.7, 33.2, 22.0, 14.0; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₂S (345.8): C 62.51; H 4.66; N 4.05. Found: C 62.38; H 4.73; N 3.91.

6.3.16 3-(4-Tert-butylphenyl)-6-chloro-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2p), yellow solid, yield 25%, mp 226-229°C, IR (ν CO) 1753 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.9$ Hz, H7), 7.58-7.48 (3H, m, H8, H2', H6'), 7.33-7.24 (2H, m, H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 151.2, 148.7, 144.5, 137.4, 135.8, 130.0, 129.7, 127.7, 126.4, 122.1, 119.2, 34.7, 31.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₂S (345.8): C 62.51; H 4.66; N 4.05; S: 9.27. Found: C 62.81; H 4.74; N 3.82; S: 9.43.

6.3.17 3-(4-Tert-butylphenyl)-7-chloro-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2q), yellow solid, yield 33%, mp 147-148°C, IR (ν CO) 1745 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.73 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.56-7.47 (3H, m, H6, H2', H6'), 7.31-7.25 (2H, m, H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.8, 151.2, 150.2, 144.5, 140.7, 137.4, 133.0, 128.4, 127.8, 126.3, 120.1, 116.8, 34.7, 31.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNO₂S (345.8): C 62.51; H 4.66; N 4.05; S: 9.27. Found: C 62.30; H 4.63; N 4.10; S: 9.61.

6.3.18 3-(4-Tert-butylphenyl)-6-fluoro-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-one (2r), yellow solid, yield 29%, mp 161-163°C, IR (ν CO) 1754 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, dd, $J=9.4$ Hz, $J=3.5$ Hz, H5), 7.81-7.71 (1H, m, H7), 7.57 (1H, dd overlapped, $J=9.4$ Hz, $J=4.7$ Hz, H8), 7.56-7.49 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.33-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ

191.7 (d, $J=2.9$ Hz), 158.8 (d, $J=242.5$ Hz), 151.2, 146.3, 144.7, 137.5, 127.7, 126.4, 123.7 (d, $J=24.8$ Hz), 120.0 (d, $J=8.7$ Hz), 119.3 (d, $J=8.1$ Hz), 116.2 (d, $J=26.5$ Hz), 34.7, 31.3; Anal calc. for $C_{18}H_{16}FNO_2S$ (329.4): C 65.63; H 4.90; N 4.25; S: 9.73. Found: C 65.49; H 4.96; N 4.15; S: 9.39.

6.3.19 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-7-methyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-one (2s), yellow solid, yield 31%, mp 156-159°C, IR (ν CO) 1746 cm^{-1} ; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.18 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H5), 7.55-7.47 (2H, m, H2', H6'), 7.32-7.23 (4H, m, H6, H8, H3', H5'), 2.44 (3H, s, CH₃), 1.33 (9H, s, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 192.5, 151.0, 149.7, 148.1, 145.0, 137.5, 131.4, 127.9, 127.0, 126.2, 118.9, 116.4, 34.6, 31.3, 21.4; Anal calc. for $C_{19}H_{19}NO_2S$ (325.43): C 70.13; H 5.88; N 4.30; S 9.85. Found: C 70.18; H 5.98; N 4.20; S 9.50.

6.3.20 6-Bromo-3-(4-methylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3a), red solid, yield 31%, mp 246-248 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.45 (d, 1H, $J=2.40$ Hz, H5), 7.81 (dd, 1H, $J=8.77$ Hz, $J=2.40$ Hz, H7), 7.39-7.34 (m AA', BB', 2H, H2', H6'), 7.25 (d, 1H, $J=8.77$ Hz, H8), 7.12-7.06 (m AA', BB', 2H, H3', H5'), 2.46 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 185.5, 177.0, 148.5, 140.5, 139.2, 138.6, 134.2, 130.7, 127.2, 123.3, 119.5, 118.0, 21.6; Anal calc. for $C_{15}H_{10}BrNOS_2$ (364.3): C 49.46; H 2.77; N 3.85; S 17.60. Found: C 49.23; H 2.96; N 3.62; S 17.32.

6.3.21 6-Bromo-3-(4-ethylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3b), red solid, yield 17%, mp 195°C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 8.05 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 144.3, 141.5, 138.9, 133.1, 129.2, 127.8, 123.9, 119.0, 118.5, 28.0, 15.5; Anal calc. for $C_{16}H_{12}BrNOS_2$ (378.3): C 50.80; H 3.20; N 3.70; S 16.95. Found: C 50.64; H 3.25; N 3.44; S 16.78.

6.3.22 6-Chloro-3-(4-ethylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3c), red solid, yield 21%, mp 173-174°C; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.12 (1H, d, $J=2.3$ Hz, H5), 7.93 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H7), 7.63 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.38-7.29 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, $J=7.6$ Hz, CH₂), 1.22 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 144.3, 141.5, 136.2, 130.7, 130.0, 129.1, 127.8, 123.6, 118.9, 28.0, 15.4; Anal calc. for

C₁₆H₁₂ClNOS₂ (333.9): C 57.56; H 3.62; N 4.20; S 19.21. Found: C 57.45; H 3.53; N 4.04; S 18.82.

6.3.23 7-Chloro-3-(4-ethylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3d), red solid, yield 50%, mp 205-208°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.20 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H5), 7.84 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H8), 7.53 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=1.8 Hz, H6), 7.37-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.66 (2H, q, *J*=7.6 Hz, CH₂), 1.22 (3H, t, *J*=7.6 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.9, 150.2, 144.3, 141.5, 141.2, 133.1, 129.1, 127.9, 127.1, 121.5, 116.5, 28.0, 15.4; Anal calc. for C₁₆H₁₂ClNOS₂ (333.9): C 57.56; H 3.62; N 4.20; S 19.21. Found: C 57.27; H 3.53; N 3.99; S 19.03.

6.3.24 6-Bromo-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3e), red solid, yield 32%, mp 181-182°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 8.04 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.03-2.86 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 148.9, 141.5, 138.9, 133.0, 127.8, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 33.3, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄BrNOS₂ (392.34): C 52.04; H 3.60; N 3.57, S 16.35. Found: C 51.78; H 3.48; N 3.47, S 16.20.

6.3.25 6-Chloro-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3f), red solid, yield 28%, mp 163-166°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.13 (1H, d, *J*=2.6 Hz, H5), 7.94 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.6 Hz, H7), 7.63 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.41-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.85 (1H, CH), 1.24 (6H, d, *J*=6.5 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.0, 177.8, 148.9, 148.7, 141.6, 136.1, 130.7, 130.0, 127.8, 127.7, 123.6, 118.9, 33.3, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄ClNOS₂ (347.89): C 58.69; H 4.06; N 4.03; S 18.43. Found: C 58.27; H 3.90; N 4.07; S: 18.75.

6.3.26 7-Chloro-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3g), red solid, yield 24%, mp 200-202°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.19 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5), 7.83 (1H, d, *J*=2.3 Hz, H8), 7.53 (1H, dd, *J*=8.2 Hz, *J*=2.3 Hz, H6), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.86 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, *J*=6.4 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.9, 150.1, 148.8, 141.5, 141.2, 133.1, 127.9, 127.7, 127.1, 121.5, 116.5, 33.3, 24.0; Anal calc. for

C₁₇H₁₄ClNOS₂ (347.89): C 57.69; H 4.06; N 4.03, S 18.43. Found: C 57.45; H 3.89; N 3.86, S 18.56.

6.3.27 6-Fluoro-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3h), red solid, yield 17%, mp 141-143°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.90 (1H, dd, *J*=9.4 Hz, *J*=2.9 Hz, H5), 7.84-7.76 (1H, m, H7), 7.67 (1H, dd, *J*=9.4 Hz, *J*=4.1 Hz, H8), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.27-7.20 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.85 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, *J*=7.0 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.2 (d, *J*=3.5 Hz), 177.9, 159.4 (d, *J*=244.1 Hz), 148.8, 146.5 (d, *J*=1.7 Hz), 141.6, 127.8, 127.7, 124.1 (d, *J*=25.3 Hz), 123.6 (d, *J*=-9.2 Hz), 119.2 (d, *J*=8.7 Hz), 116.2 (d, *J*=27.0 Hz), 33.3, 24.0; Anal calc. for C₁₇H₁₄FNO₂S (331.4): C 61.61; H 4.26; N 4.23; S: 19.35. Found: C 61.74; H 4.37; N 3.96; S: 19.43.

6.3.28 3-(4-isopropylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3i), red solid, yield 29%, mp 195-197°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.10 (1H, d, *J*=8.2 Hz, H5), 7.40-7.26 (4H, m, H6, H8, H2', H6'), 7.25-7.18 (2H, m, H3', H5'), 3.01-2.86 (1H, m, CH), 2.44 (3H, s, CH₃), 1.24 (6H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 188.0, 178.4, 149.8, 148.7, 148.6, 141.6, 131.4, 128.1, 128.0, 127.6, 120.4, 116.0, 33.3, 24.0, 21.5; Anal calc. for C₁₈H₁₇NOS₂ (327.47): C 66.02; H 5.23; N 4.28; S 19.58. Found: C 66.00; H 5.34; N 4.18; S 19.19.

6.3.29 6-Bromo-3-(4-sec-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3j), red solid, yield 38%, mp 161-162°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 8.04 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.55 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.58 (1H, m, CH), 1.67-1.47 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₂), 0.78 (3H, t, *J*=7.2 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.7, 149.1, 147.7, 141.6, 138.9, 133.0, 128.3, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 40.7, 30.8, 21.6, 12.2; Anal calc. for C₁₈H₁₆BrNOS₂ (406.37): C 53.20; H 3.97; N 3.45, S 15.78. Found: C 52.90; H 3.95; N 3.31, S 15.80.

6.3.30 3-(4-Sec-butylphenyl)-6-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithione (3k), red solid, yield 27%, mp 153-154°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H5), 7.91 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.5 Hz, H7), 7.54 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.57 (1H, m, CH), 1.66-1.50 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH₂), 0.80 (3H, t, *J*=7.2 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 147.7, 141.6, 136.2, 130.7, 130.0,

128.3, 127.8, 123.6, 118.9, 40.7, 30.8, 21.6, 12.2; Anal calc. for C₁₈H₁₆CINOS₂ (361.92): C 59.74; H 4.46; N 3.87, S 17.72. Found: C 59.48; H 4.36; N 3.80, S 17.95.

6.3.31 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3l), red solid, yield 32%, mp 169-170°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.20 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H5), 7.83 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H8), 7.53 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=1.8 Hz, H6), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.25-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.75-2.56 (1H, m, CH), 1.68-1.47 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃), 0.78 (3H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.9, 150.2, 147.6, 141.6, 141.2, 133.1, 128.2, 127.8, 127.1, 121.5, 116.5, 40.7, 30.8, 21.6, 12.2; Anal calc. for C₁₈H₁₆CINOS₂ (361.9): C 59.74; H 4.46; N 3.87; S: 17.72. Found: C 59.76; H 4.60; N 3.64; S: 17.36.

6.3.32 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-6-fluoro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3m), red solid, yield 25%, mp 107-109°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.90 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.9 Hz, H5), 7.85-7.75 (1H, m, H7), 7.66 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=4.7 Hz, H8), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.57 (1H, m, CH), 1.67-1.47 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.3 Hz, CH₃), 0.78 (3H, d, *J*=7.3 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.2 (d, *J*=3.5 Hz), 177.9, 159.4 (d, *J*=244.1 Hz), 147.7, 146.5, 141.7, 128.2, 127.8, 124.1 (d, *J*=24.8 Hz), 123.6 (d, *J*=8.7 Hz), 119.2 (d, *J*=8.7 Hz), 116.2 (d, *J*=26.5 Hz), 40.7, 30.8, 21.6, 12.2; Anal calc. for C₁₈H₁₆FNOS₂ (345.5): C 62.58; H 4.67; N 4.05; S: 18.56. Found: C 62.48; H 4.38; N 4.18; S: 18.24.

6.3.33 3-(4-*Sec*-butylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3n), red solid, yield 40%, mp 169-170°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.11 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H5), 7.39-7.27 (4H, m, H6, H8, H2', H6'), 7.25-7.17 (2H, m, H3', H5'), 2.73-2.59 (1H, m, CH), 2.45 (3H, s, CH₃), 1.65-1.48 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, *J*=7.1 Hz, CH₃), 0.79 (3H, t, *J*=7.1 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 188.0, 178.3, 149.8, 148.6, 147.5, 141.6, 131.4, 128.1, 128.0, 120.3, 116.0, 40.7, 30.8, 21.6, 21.5, 12.2; Anal calc. for C₁₉H₁₉NOS₂ (341.50): C 66.83; H 5.61; N 4.10; S 18.78. Found: C 66.77; H 5.52; N 4.27; S 18.49.

6.3.34 3-(4-Butylphenyl)-6-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3o), red solid, yield 26%, mp 125-127°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.13 (1H, d, *J*=2.6 Hz, H5), 7.94 (1H, dd, *J*=8.8 Hz, *J*=2.6 Hz, H7), 7.63 (1H, d, *J*=8.8 Hz, H8), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24-7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.63 (2H, t, *J*=7.5 Hz, CH₂),

1.67-1.51 (2H, m, CH₂), 1.41-1.24 (2H, m, CH₂), 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 143.0, 141.5, 136.2, 130.7, 130.0, 129.6, 127.8, 123.6, 118.9, 34.7, 33.1, 22.0, 14.0; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNOS₂ (361.9): C 59.74; H 4.46; N 3.87. Found: C 59.56; H 4.44; N 3.55.

6.3.35 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-6-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3p), red solid, yield 22%, mp 219-222; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.13 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H5), 7.94 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.9$ Hz, H7), 7.63 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H8), 7.56-7.48 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.20 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 151.2, 148.7, 141.3, 136.1, 130.7, 130.0, 127.5, 126.6, 123.5, 118.9, 34.7, 31.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNOS₂ (361.9): C 59.74; H 4.46; N 3.87; S: 17.72. Found: C 59.60; H 4.45; N 3.71; S: 17.48.

6.3.36 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-7-chloro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3q), red solid, yield 29%, mp 255-256°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.20 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.82 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.56-7.48 (3H, m, H6, H2', H6'), 7.27-7.19 (2H, m, H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.4, 177.8, 151.1, 150.1, 141.2, 141.2, 133.1, 127.5, 127.1, 126.6, 121.5, 116.5, 34.7, 31.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆ClNOS₂ (361.9): C 59.74; H 4.46; N 3.87; S: 17.72. Found: C 59.83; H 4.38; N 3.99; S: 18.15.

6.3.37 3-(4-*Tert*-butylphenyl)-6-fluoro-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3r), red solid, yield 40%, mp 168-169°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.90 (1H, dd, $J=8.9$ Hz, $J=2.9$ Hz, H5), 7.80 (1H, dt, $J=8.9$ Hz, $J=2.9$ Hz, H7), 7.66 (1H, dd, $J=8.9$ Hz, $J=4.7$ Hz, H8), 7.56-7.48 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.27-7.20 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 187.2 (d, $J=3.5$ Hz), 177.9, 159.4 (d, $J=24.4$ Hz), 151.1, 146.5, 141.4, 127.5, 126.6, 124.1 (d, $J=24.8$ Hz), 123.5 (d, $J=9.2$ Hz), 119.2 (d, $J=8.7$ Hz), 116.2 (d, $J=26.5$ Hz), 34.7, 31.3; Anal calc. for C₁₈H₁₆FNOS₂ (345.5): C 62.58; H 4.67; N 4.05; S: 18.56. Found: C 62.50; H 4.60; N 3.88; S: 18.21.

6.3.38 3-(4-*tert*-butylphenyl)-7-methyl-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithione (3s), red solid, yield 16%, mp 260-262°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.11 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H5), 7.55-7.47 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.39 (1H, s, H8), 7.34-7.26 (1H, m, H6), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.45 (3H, s, CH₃), 1.32 (9H, s, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 188.0, 178.3, 151.0, 149.8, 148.6, 141.3, 131.4, 128.1

127.7, 126.5, 120.3, 116.0, 34.7, 31.4, 21.5; Anal. calc. for C₁₉H₁₉NOS₂ (341.50): C 66.83; H 5.61; N 4.10; S 18.78. Found: C 67.13; H 5.59; N 4.26; S 18.53.

6.4 Antimycobacterial susceptibility testing

For the *in-vitro* evaluation of the antimycobacterial activity of the substances, the following strains were used: *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 (identical with H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (identical with ATCC 12 478), *M. avium* CNCTC My 330/88 (identical with ATCC 25291), obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague, and a clinical isolate of *M. kansasii* 6509/ 96. The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague). Each strain was simultaneously inoculated into a Petri dish containing the Löwenstein-Jensen medium for the control of sterility of the inoculum and its growth. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 and 0.25 µmol/l. The MICs were determined after incubation at 37 °C for 14 days and 21 days. The MIC was the lowest concentration of the antimycobacterially effective substance (on the above concentration scale), at which the inhibition of the growth of mycobacteria occurred. The evaluation was repeated three times and the values of the MIC were the same.

Acknowledgements

This work is financially supported by project No. MSM 0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic and Grant Agency of Charles University (GAUK 11809/2009/B-CH/FAF).

The authors have declared no conflict of interest.

References

1. World Health Organization: *10 facts about tuberculosis* [cit. 2009-10-23]. Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/tuberculosis/en/index.html>
2. *WHO Fact Sheet No 104, 2010*. [cit. 2010-06-02]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>

3. A. Alahari, X. Trivelli, Y. Guérardel, G. L. Dover, G. S. Besra, J. C. Sacchetini, R. C. Reynolds, G. D. Coxon, L. Kremer, *Plos One* **2007**, 12.
4. B. Phetsuksiri, M. Jackson, H. Scherman, M. McNeil, G. S. Besra, A. R. Baulard, R. A. Slayden, A. E. DeBarber, C. E. Barry, M. S. Baird, D. C. Crick, P. J. Brennan, *J Biol Chem.* **2003**, 278, 53123.
5. E. K. Schroeder, O. N. Souza de, D. S. Santos, J. S. Blanchard, L. A. Basso, *Curr Pharm Biotechnol.* **2002**, 3, 197.
6. D. J. Hlasta, J. P. Demers, B. D. Foleno, S. A. Fraga-Spano, J. Guan, J. J. Hilliard, M. J. Macielang, K. A. Ohemeng, C. M. Sheppard, Z. Sui, G. C. Webb, M. A. Weidner-Wells, H. Werblood, J. F. Barrett, *Bioorg Med Chem Lett.* **1998**, 8, 1923.
7. M. J. Macielang, J. P. Demers, S. A. Fraga-Spano, D. J. Hlasta, S. G. Johnson, R. M. Konojia, R. K. Russel, Z. Sui, M. A. Weidner-Wells, H. Werblood, B. D. Foleno, R. M. Golschmidt, M. J. Loeloff, G. C. Webb, J. F. Barrett, *J Med Chem.* **1998**, 41, 2939.
8. K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, J. Kuneš, V. Klimešová, K. Palát, J. Kaustová, *Arch Pharm Chem Life Sci.* **2007**, 340, 264.
9. L. Kubicová, M. Šustr, M. Macháček, K. Waisser, V. Buchta, P. Kubanová, J. Kaustová, K. Králová, *International Electronic Conferences on Synthetic Organic Chemistry* **2004**, 304.
10. K. Waisser, J. Hladůvková, P. Holý, M. Macháček, P. Karajannis, L. Kubicová, V. Klimešová, J. Kuneš, J. Kaustová, *Chem Pap.* 2001, 55, 323.
11. K. Waisser, J. Matyk, J. Kuneš, R. Doležal, J. Kaustová, H. M. Dahse, *Arch Pharm Chem Life Sci.* **2008**, 341, 800.

Scheme 1. Synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

Table 1. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones.

Table 2. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones.

Table 3. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

Figure 1. Increase in the biological activity after the replacement of the oxo group with the thioxo group.

Table 4. Activity contribution of the Free-Wilson analyses of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and statistical significances of correlation.

Table 5. Activity contribution of the Free-Wilson analyses of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones and statistical significances of correlation.

Scheme 1. Synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones (**1**), 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones (**2**) and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones (**3**).

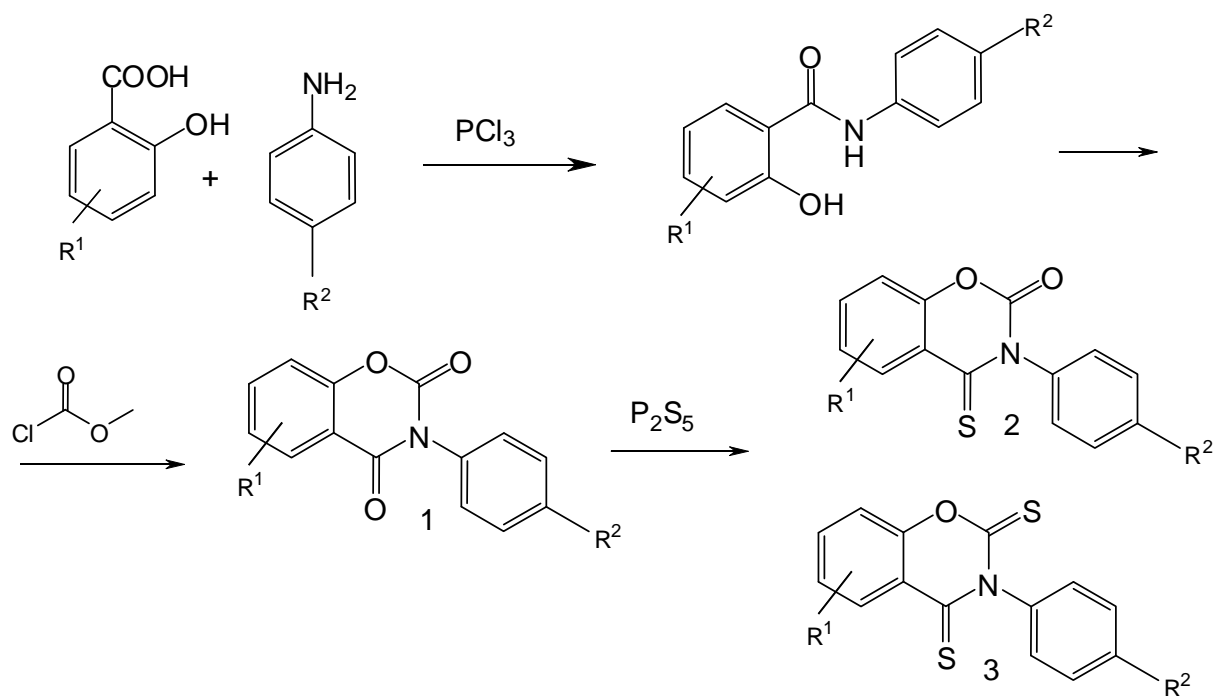


Table 1. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones.

	Compound		MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
			Incubation time 14 d/21 d			
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
1a	6-Br	methyl	16/16 ^a	31/31 ^a	62/62 ^a	-*
1b	6-Br	ethyl	8/8	32/32	8/16	16/16
1c	6-Cl	ethyl	8/16 ^c	16/32 ^c	16/16 ^c	16/16 ^c
1d	7-Cl	ethyl	8/8	8/16	16/16	16/16
1e	6-Br	isopropyl	2/4	8/16	8/8	4/8
1f	6-Cl	isopropyl	4/8 ^c	32/32 ^c	8/16 ^c	8/16 ^c
1g	7-Cl	isopropyl	4/4	8/16	8/16	8/8
1h	6-F	isopropyl	8/8	8/16	8/8	8/16
1i	7-CH ₃	isopropyl	n/n	n/n	n/n	32/n
1j	6-Br	<i>sec</i> -butyl	4/8	16/32	8/8	8/16
1k	6-Cl	<i>sec</i> -butyl	4/8 ^c	32/32 ^c	16/16 ^c	16/16 ^c
1l	7-Cl	<i>sec</i> -butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
1m	6-F	<i>sec</i> -butyl	8/8	8/8	8/8	4/8
1n	7-CH ₃	<i>sec</i> -butyl	n/n	n/n	n/n	32/n
1o	6-Cl	butyl	16/16 ^b	16/16 ^b	8/8 ^b	8/16 ^b
1p	6-Cl	<i>tert</i> -butyl	8/16 ^b	16/32 ^b	8/16 ^b	8/8 ^b
1q	7-Cl	<i>tert</i> -butyl	4/4 ^b	4/8 ^b	8/16 ^b	8/8 ^b
1r	6-F	<i>tert</i> -butyl	16/16	16/16	16/16	8/16
1s	7-CH ₃	<i>tert</i> -butyl	n/n	n/n	n/n	n/n
INH			0.5/0.5	>250/>250	>250/>250	8/8

^a Waisser, Hladůvková (10), ^b Waisser, Matyk (8) ^c Kubicová (9), * not tested, n: the MIC value could not be determined due to the limited solubility of the compound in the test medium

Table 2. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones.

Compound			MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
			Incubation time 14 d/21 d			
			<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
R ¹	R ²		My 331/ 88	My 330/ 88	My 235/ 80	6 509/ 96
2a	6-Br	methyl	0.5/1	32/32	2/4	2/4
2b	6-Br	ethyl	0.5/0.5	32/32	8/16	4/8
2c	6-Cl	ethyl	0.5/0.5	16/16	8/8	4/4
2d	7-Cl	ethyl	0.5/0.5	8/8	8/8	8/8
2e	6-Br	isopropyl	0.25/0.5	4/8	32/62.5	4/8
2f	6-Cl	isopropyl	0.5/1	32/125	8/16	1/2
2g	7-Cl	isopropyl	0.5/1	8/8	8/8	4/8
2h	6-F	isopropyl	0.25/0.5	0.5/1	2/4	4/4
2i	7-CH ₃	isopropyl	0.25/0.5	0.5/1	2/4	1/2
2j	6-Br	<i>sec</i> -butyl	0.25/0.5	16/32	4/8	2/4
2k	6-Cl	<i>sec</i> -butyl	0.5/1	32/32	8/8	4/8
2l	7-Cl	<i>sec</i> -butyl	1/2	8/8	4/8	1/2
2m	6-F	<i>sec</i> -butyl	0.25/0.5	1/1	4/4	2/4
2n	7-CH ₃	<i>sec</i> -butyl	0.25/0.5	0.5/0.5	1/2	0.5/1
2o	6-Cl	butyl	1/2	8/16	8/16	4/4
2p	6-Cl	<i>tert</i> -butyl	0.25/0.5	1/2	8/8	4/8
2q	7-Cl	<i>tert</i> -butyl	2/2	4/8	4/8	2/4
2r	6-F	<i>tert</i> -butyl	0.25/0.5	0.5/1	4/8	8/8
2s	7-CH ₃	<i>tert</i> -butyl	0.25/0.5	0.25/0.5	2/2	1/1
INH			0.5/0.5	>250/>250	>250/>250	8/8

Table 3. *In-vitro* antimycobacterial activity of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

Compound			MIC ($\mu\text{mol/l}$)			
			Incubation time 14 d/21 d			
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96
3a	6-Br	methyl	0.5/1	15/30	4/4	4/4
3b	6-Br	ethyl	1/2	62.5/62.5	8/16	4/8
3c	6-Cl	ethyl	0.5/0.5	8/16	8/8	4/6
3d	7-Cl	ethyl	0.5/0.5	4/8	8/16	8/16
3e	6-Br	isopropyl	0.5/1	8/16	32/62.5	4/8
3f	6-Cl	isopropyl	0.5/1	32/125	8/16	1/2
3g	7-Cl	isopropyl	0.5/1	8/8	4/8	4/4
3h	6-F	isopropyl	0.25/0.5	0.5/1	4/8	2/4
3i	7-CH ₃	isopropyl	0.5/1	0.5/0.5	2/4	1/2
3j	6-Br	<i>sec</i> -butyl	1/2	32/32	4/8	2/4
3k	6-Cl	<i>sec</i> -butyl	1/2	16/32	8/16	4/8
3l	7-Cl	<i>sec</i> -butyl	1/1	4/8	4/8	1/2
3m	6-F	<i>sec</i> -butyl	0.25/0.25	0.5/1	2/4	2/4
3n	7-CH ₃	<i>sec</i> -butyl	0.25/0.5	0.25/0.5	2/2	0.5/1
3o	6-Cl	butyl	2/4	8/16	8/8	8/8
3p	6-Cl	<i>tert</i> -butyl	0.25/0.5	1/2	8/8	8/8
3q	7-Cl	<i>tert</i> -butyl	0.5/0.5	2/4	2/4	2/4
3r	6-F	<i>tert</i> -butyl	0.5/0.5	0.5/1	8/8	4/8
3s	7-CH ₃	<i>tert</i> -butyl	0.25/0.5	0.5/1	2/2	1/2
INH			0.5/0.5	>250/>250	>250/>250	8/8

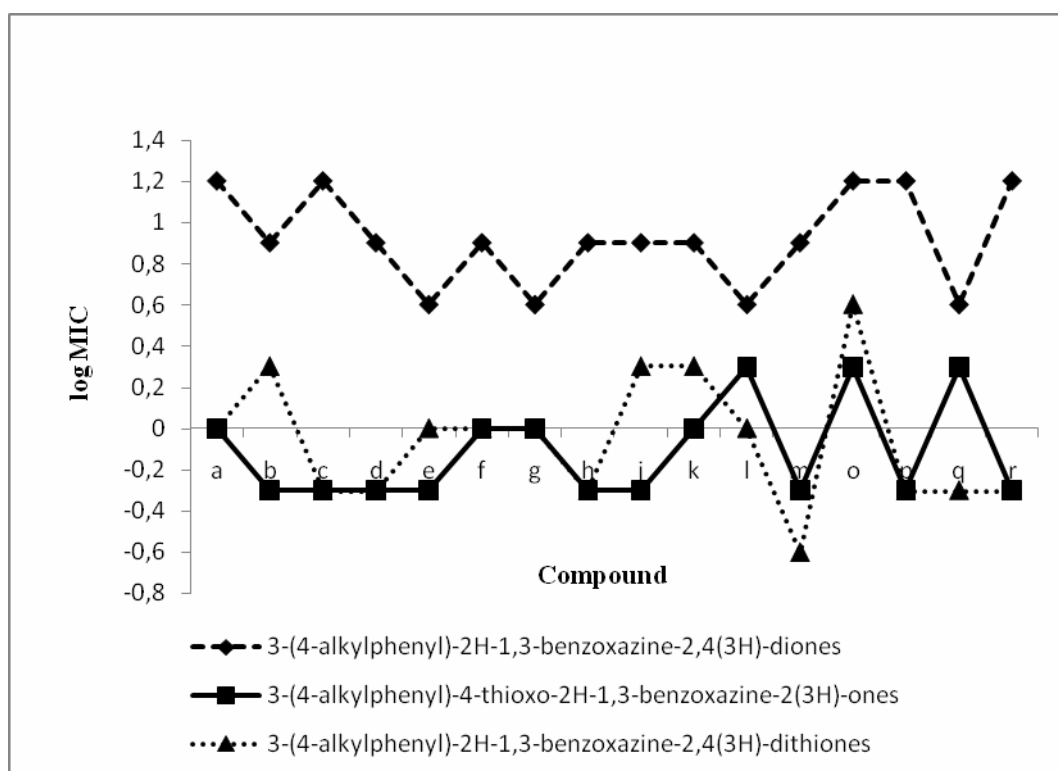


Figure 1. An increase in the biological activity against *M. tuberculosis* (21 d) after the replacement of the oxo group with the thioxo group.

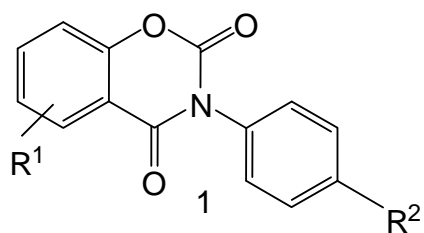
Table 4. Activity contribution of the Free-Wilson analyses of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and statistical significances of correlation.

Parameter	$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/L}$) 14 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
R ¹ 7-Cl	0	0	0	0
6-Cl	-0.482 (± 0.197)	0.180 (± 0.208)	0.060 (± 0.144)	-0.060 (± 0.161)
6-Br	-0.295 (± 0.212)	0.176 (± 0.224)	0.202 (± 0.155)	0.133 (± 0.173)
6-F	-0.563 (± 0.237)	-0.949 (± 0.251)	-0.292 (± 0.173)	0.218 (± 0.194)
7-CH ₃	-0.563 (± 0.237)	-1.150 (± 0.251)	-0.594 (± 0.173)	-0.485 (± 0.194)
R ² methyl	-0.301 (± 0.440)	-0.028 (± 0.466)	-0.602 (± 0.322)	-0.602 (± 0.359)
ethyl	-0.337 (± 0.380)	-0.244 (± 0.403)	0.115 (± 0.278)	-0.092 (± 0.311)
isopropyl	-0.396 (± 0.371)	-0.499 (± 0.393)	0.206 (± 0.272)	-0.370 (± 0.304)
sec-butyl	-0.335 (± 0.371)	-0.318 (± 0.393)	-0.034 (± 0.272)	-0.551 (± 0.304)
tert-butyl	-0.269 (± 0.394)	-0.925 (± 0.417)	0.108 (± 0.288)	-0.237 (± 0.322)
propyl	0	0	0	0
butyl	0.767 (± 0.380)	-0.444 (± 0.403)	0.315 (± 0.278)	0.109 (± 0.311)
μ_0	0.295 (± 0.376)	1.329 (± 0.398)	0.701 (± 0.275)	0.770 (± 0.308)
r	0.90	0.94	0.89	0.88
s	0.311	0.329	0.227	0.254
F	4.94	8.92	4.06	3.58
n	22	22	22	22

Table 5. Activity contribution of the Free-Wilson analyzes of 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones and statistical significances of correlation.

Parameter		$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/L}$) 14 d			
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
R ¹	7-Cl	0	0	0	0
	6-Cl	-0.180 (± 0.168)	0.301 (± 0.200)	0.241 (± 0.135)	0.120 (± 0.150)
	6-Br	-0.234 (± 0.181)	0.830 (± 0.216)	0.299 (± 0.146)	0.200 (± 0.162)
	6-F	-0.280 (± 0.202)	-0.888 (± 0.241)	0.047 (± 0.163)	0.096 (± 0.181)
	7-CH ₃	-0.280 (± 0.202)	-0.988 (± 0.241)	-0.254 (± 0.163)	-0.406 (± 0.181)
R ²	methyl	-0.301 (± 0.375)	-0.329 (± 0.447)	-0.301 (± 0.303)	-0.301 (± 0.336)
	ethyl	-0.016 (± 0.324)	0.048 (± 0.387)	0.119 (± 0.262)	-0.108 (± 0.291)
	isopropyl	-0.026 (± 0.317)	0.136 (± 0.378)	-0.009 (± 0.256)	-0.464 (± 0.284)
	<i>sec</i> -butyl	0.095 (± 0.317)	-0.045 (± 0.378)	-0.129 (± 0.256)	-0.525 (± 0.284)
	<i>tert</i> -butyl	-0.323 (± 0.336)	-0.357 (± 0.401)	-0.011 (± 0.271)	-0.204 (± 0.302)
	propyl	0	0	0	0
	butyl	1.120 (± 0.324)	-0.149 (± 0.387)	0.320 (± 0.262)	0.194 (± 0.291)
	μ_0	-0.234 (± 0.321)	0.676 (± 0.383)	0.604 (± 0.259)	0.703 (± 0.288)
	r	0.93	0.95	0.86	0.90
	s	0.265	0.316	0.214	0.238
	F	6.57	10.85	3.12	4.56
	n	22	22	22	22

Graphical abstract



The replacement of the oxo group with the thiooxo group in 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones (1) increases the antimycobacterial activity. The most active derivatives are more active than isonicotinhydrazide (INH).

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K.: TLC Study of the Lipophilicity of New Antibacterial Active Benzoxazine Derivatives Containing a Thioxo Group. *J. Planar. Chromatography.*, under review.

A TLC Study of the Lipophilicity of New Antimycobacterial Active Benzoxazine Derivatives Containing a Thioxo Group

Eva Petrlíková*, Karel Waisser¹

Key Words

Benzoxazine

RP-TLC

Lipophilicity

R_M

$\log P$

Summary

Experimental R_M values of a series of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were obtained by a reversed-phase TLC system. The mobile phase was a phosphate buffer with volume fractions of acetone between 80 and 60%. The retention constants R_M^0 were compared with the partition coefficients calculated using different software products. The lipophilicity contributions of the substituents were compared with the π constants.

E. Petrlíková, K. Waisser, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: Eva.Petrlikova@faf.cuni.cz; Fax: +420 465067166

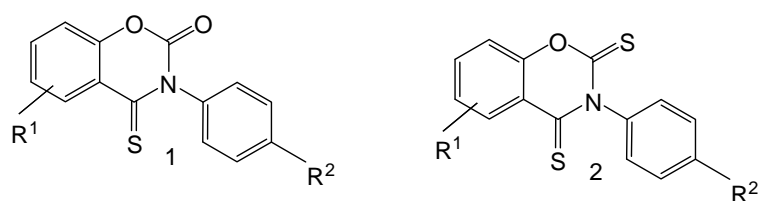
1 Introduction

Antibiotics helped to save many lives and to bring many serious infectious diseases under control. Presently, there are an increasing number of pathogenic organisms resistant to antibiotics and also the World Health Organization proclaimed the resistance to antibiotics to be a serious global problem [1]. The development of serious infections is moreover often associated with immunocompromised persons, such as HIV, elderly, and cancer patients and transplant recipients [2]. The problem with the resistance to antibiotics under use needs a solution and the development of new drugs with a better effectivity and a lower toxicity is the subject of scientific research.

Lipophilicity is one of the most informative and successful physicochemical properties in medicinal chemistry influencing the transport of a molecule through cellular membranes. Lipophilicity is determined experimentally as partition of a soluble compound between an aqueous and an organic phase and is indicated as the partition ($\log P$) or the distribution ($\log D$) coefficient [3]. The lipophilicity application is used very often in quantitative structure-activity relationship studies and in a molecular modelling as well [4, 5].

Our research team focuses on the development of new potential antibiotics. Recently we have prepared a group of new benzoxazine derivatives containing a thioxo group. The most active derivatives of 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones show a promising antimycobacterial activity and are better than isonicotinhydrazide (INH). Since the lipophilicity of the drug plays an important role in its action at all levels of organization (enzyme, membrane, cell, etc.), we decided to study the lipophilicity of these benzoxazine derivatives. The shake-flask method is very time-consuming and that is why we employed the reversed-phase chromatographic approach.

3-(4-Alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones form a swimmingly separable mixture and column chromatography is necessary for their separation. A mixture of hexane and acetone (3:1) represents the mobile phase. Therefore the acetone solutions with a phosphate buffer were chosen for the lipophilicity study. The overview of the compounds under study is presented in Table 1.



Comp.	R ¹	R ²	Comp.	R ¹	R ²
a	6-F	isopropyl	h	6-Br	<i>sec</i> -butyl
b	6-Cl	isopropyl	i	7-Cl	<i>sec</i> -butyl
c	6-Br	isopropyl	j	7-CH ₃	<i>sec</i> -butyl
d	7-Cl	isopropyl	k	6-F	<i>tert</i> -butyl
e	7-CH ₃	isopropyl	l	6-Cl	<i>tert</i> -butyl
f	6-F	<i>sec</i> -butyl	m	7-Cl	<i>tert</i> -butyl
g	6-Cl	<i>sec</i> -butyl	n	7-CH ₃	<i>tert</i> -butyl

Table 1. Overview of the compounds.

2 Experimental

All the tested compounds were synthesized in our laboratory. The synthesis, analytical data and antimycobacterial activity of the compounds will be soon published in a journal. Analytical grade chemicals were used for the synthesis as well as for lipophilicity testing.

Acetone was supplied by Penta (Czech Republic), sodium hydrogen phosphate and potassium dihydrogen phosphate by Lachema (Czech Republic).

2.1 Lipophilicity testing

TLC was performed on 20 x 20 cm TLC plates precoated with RP-18 F_{254S} (Merck Company). The mobile phase was represented by a phosphate buffer at pH 7.4 with acetone. The concentrations of acetone in the mobile phase were 80, 75, 70, 65 and 60%. All the samples were put on in 5-10% solutions in acetone (2-4 μ l). All measurements were performed at ambient temperature. After development and drying of the plates, the spots were observed under an UV lamp. The average R_F values were obtained from three measurements for each sample. The R_M values were calculated by means of the formula: $R_M = \log (1/R_F - 1)$ [6].

2.2 Calculations

The following software products were used for $\log P$ calculation: AB/LogP (Pharma Algorithms, Lithuania/Canada), ACD/logP (Advanced Chemistry Development), ALOGP (Talete SRL, Milano, Italy), ALOGPs (Virtual Computational Chemistry Laboratory, Germany), KowWIN (Syracuse Inc.), MiLogP (Molinspiration Chemoinformatics, Slovak Republic), MLOGP (Talete SRL, Milano, Italy), XLOGP₂ (Institute of Physical Chemistry, Peking University, China) and XLOGP₃ (Shanghai Institute of Organic Chemistry, Shanghai, China) that are together available on internet [7, 8]. ChemBioDraw Ultra 11.0 is commercially available. The π constants were taken from the literature [9].

3 Results and discussion

The early experiments of the chromatographic work had shown that the tested compounds stayed at the starting line when the mobile phase was represented only by a phosphate buffer. An addition of acetone to the mobile phase was necessary for longer migrations.

The comparison of the R_M versus the composition of the mobile phase showed a linear relationship which enables the extrapolation to zero acetone content and R_M^0 calculation. Soczewinski-Wachtmeister equations [10] together with the correlation coefficients are presented in Table 2.

Table 2. Soczewinski-Wachtmeister equations and the correlation coefficients.

Soczewinski-Wachtmeister equation					
$R_M = b \cdot c + R_M^0$					
r^2			r^2		
1a	$R_M = -0.044 c + 3.423$	0.995	2a	$R_M = -0.048 c + 3.955$	0.990
1b	$R_M = -0.046 c + 3.638$	0.998	2b	$R_M = -0.053 c + 4.378$	0.996
1c	$R_M = -0.049 c + 3.895$	0.999	2c	$R_M = -0.056 c + 4.637$	0.996
1d	$R_M = -0.046 c + 3.638$	0.998	2d	$R_M = -0.053 c + 4.378$	0.996
1e	$R_M = -0.045 c + 3.509$	0.997	2e	$R_M = -0.050 c + 4.129$	0.992
1f	$R_M = -0.465 c + 3.707$	0.999	2f	$R_M = -0.053 c + 4.378$	0.996
1g	$R_M = -0.050 c + 3.991$	0.998	2g	$R_M = -0.057 c + 4.793$	0.994
1h	$R_M = -0.050 c + 4.032$	0.995	2h	$R_M = -0.063 c + 5.277$	0.990
1i	$R_M = -0.050 c + 3.991$	0.998	2i	$R_M = -0.057 c + 4.869$	0.994
1j	$R_M = -0.049 c + 3.878$	0.999	2j	$R_M = -0.055 c + 4.560$	0.997
1k	$R_M = -0.046 c + 3.641$	0.997	2k	$R_M = -0.050 c + 4.378$	0.994
1l	$R_M = -0.050 c + 4.031$	0.998	2l	$R_M = -0.054 c + 4.834$	0.994
1m	$R_M = -0.050 c + 4.031$	0.998	2m	$R_M = -0.054 c + 4.834$	0.994

$$1n \quad R_M = -0.047 c + 3.757 \quad 0.998$$

$$2n \quad R_M = -0.052 c + 4.639 \quad 0.996$$

The R_M^0 's were compared with partition coefficients (ALOGPs, AC logP, AB/LogP, MiLogP, ALOGP, MLOGP, KowWIN, XLOGP₂, XLOGP₃ and LogP from ChemBioDraw Ultra 11.0) calculated using different software products (Tables 3 and 4). According to Collander equations [11, 12], we have been affirmed that R_M^0 values correlate the best with AB/logP values (Table 5).

Table 3. R_M^0 , overview of the log P values calculated by various methods.

Comp.	R_M^0	Calculated log P for 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazine-2(3 <i>H</i>)-ones									
		ALOGPs	ACD logP	AB/Log P	miLogP	ALOGP	MLOGP	KowWIN	XLOGP ₂	XLOGP ₃	ChemBioDraw
1a	3.42	4.39	5.12	4.00	3.10	5.29	4.27	4.66	4.54	4.59	4.94
1b	3.64	4.83	5.68	4.52	4.58	5.75	4.39	5.11	5.00	5.11	5.34
1c	3.90	5.10	5.76	4.61	4.71	5.84	4.51	5.35	5.19	5.18	5.61
1d	3.64	4.82	5.68	4.52	4.58	5.75	4.39	5.11	5.00	5.11	5.34
1e	3.51	4.45	5.38	4.14	4.35	5.57	4.12	5.01	4.81	4.85	5.27
1f	3.71	4.93	5.59	4.48	3.44	5.75	4.51	5.16	5.11	5.13	5.36
1g	3.99	5.31	6.14	5.00	4.93	6.21	4.62	5.60	5.57	5.66	5.76
1h	4.03	5.62	6.23	5.09	5.06	6.29	4.74	5.85	5.74	5.72	6.03
1i	4.04	5.29	6.14	5.00	4.93	6.21	4.62	5.60	5.57	5.66	5.76
1j	3.88	5.00	5.84	4.63	4.70	6.03	4.36	5.50	5.38	5.39	5.69
1k	3.64	4.90	5.55	4.47	3.29	5.50	4.51	5.12	4.95	5.13	5.41
1l	4.03	5.29	6.10	4.99	4.78	5.96	4.62	5.56	5.41	5.66	5.81
1m	4.03	5.28	6.10	4.99	4.78	5.96	4.62	5.56	5.41	5.66	5.81
1n	3.76	4.93	5.80	4.61	4.55	5.78	4.36	5.46	5.22	5.40	5.74

Table 4. R_M^0 , an overview of the log P values calculated by various methods.

Comp.	R_M^0	Calculated log P for 3-(4-alkylphenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazine-2,4(3 <i>H</i>)-dithiones									
		ALOGPs	ACD logP	AB/Log P	miLogP	ALOGP	MLOGP	KowWIN	XLOGP ₂	XLOGP ₃	ChemBioDraw
2a	3.96	4.37	5.80	4.16	3.44	6.19	4.70	5.30	4.79	5.19	6.09
2b	4.38	4.77	6.35	4.74	4.93	6.65	4.82	5.74	5.25	5.71	6.49
2c	4.64	5.01	6.43	4.93	5.06	6.74	4.94	5.99	5.42	5.78	6.76
2d	4.38	4.76	6.35	4.74	4.93	6.65	4.82	5.74	5.25	5.71	6.49
2e	4.13	4.5	6.05	4.53	4.70	6.47	4.55	5.64	5.06	5.45	6.42
2f	4.38	4.84	6.26	4.65	3.78	6.65	4.94	5.79	5.36	5.73	6.51
2g	4.79	5.26	6.81	5.23	5.27	7.11	5.05	6.23	5.82	6.26	6.91
2h	5.28	5.45	6.9	5.42	5.40	7.19	5.17	6.48	5.99	6.32	7.18
2i	4.87	5.25	6.81	5.23	5.27	7.11	5.05	6.23	5.82	6.26	6.91
2j	4.60	5.00	6.51	5.01	5.04	6.93	4.78	6.13	5.63	5.99	6.84
2k	4.38	4.87	6.22	4.64	3.63	6.4	4.94	5.75	5.2	5.73	6.56
2l	4.84	5.28	6.77	5.22	5.12	6.86	5.05	6.19	5.66	6.26	6.96
2m	4.84	5.27	6.77	5.22	5.12	6.86	5.05	6.19	5.66	6.26	6.96
2n	4.64	4.99	6.47	5.00	4.89	6.68	4.78	6.10	5.48	6.00	6.89

Table 5. Collander equations and the correlation coefficients expressing dependence between $\log P$ and R_M^0 for various methods.

3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazine-2(3 <i>H</i>)-ones			3-(4-alkylphenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazine-2,4(3 <i>H</i>)-dithiones		
Method used for $\log P$ calculation	Collander equation	r	Collander equation	r	Method character
ALOGPs	$\log P = 1.515 R_M^0 - 0.749$	0.95	$\log P = 0.896 R_M^0 + 0.865$	0.98	Using E-state descriptors
ACDlogP	$\log P = 1.473 R_M^0 + 0.193$	0.96	$\log P = 0.908 R_M^0 + 2.304$	0.96	Fragment-based method
AB/logP	$\log P = 1.515 R_M^0 - 1.115$	0.96	$\log P = 0.992 R_M^0 + 0.363$	0.97	Fragment-based method
miLogP	$\log P = 2.258 R_M^0 - 4.170$	0.74	$\log P = 1.406 R_M^0 - 1.685$	0.74	Fragment-based method
ALOGP	$\log P = 1.222 R_M^0 + 1.201$	0.91	$\log P = 0.760 R_M^0 + 3.265$	0.91	Atom-based method
MLogP	$\log P = 0.665 R_M^0 + 1.946$	0.84	$\log P = 0.419 R_M^0 + 2.982$	0.84	Using topological descriptors
KowWIN	$\log P = 1.402 R_M^0 + 0.001$	0.94	$\log P = 0.894 R_M^0 + 1.866$	0.97	Fragment-based method
XLOGP ₂	$\log P = 1.487 R_M^0 - 0.447$	0.95	$\log P = 0.934 R_M^0 + 1.178$	0.96	Atom-based method
XLOGP ₃	$\log P = 1.561 R_M^0 - 0.633$	0.95	$\log P = 0.960 R_M^0 + 1.504$	0.94	Atom-based method
Chem BioDraw Ultra 11.0	$\log P = 1.283 R_M^0 + 0.682$	0.93	$\log P = 0.827 R_M^0 + 2.921$	0.97	Fragment-based method

The AB/logP values were used to calculate the retention values R_M^0 of the compounds with an unsubstituted acyl moiety and with an unsubstituted phenyl ring. Figures 1 and 2 show the equations used for this calculation.

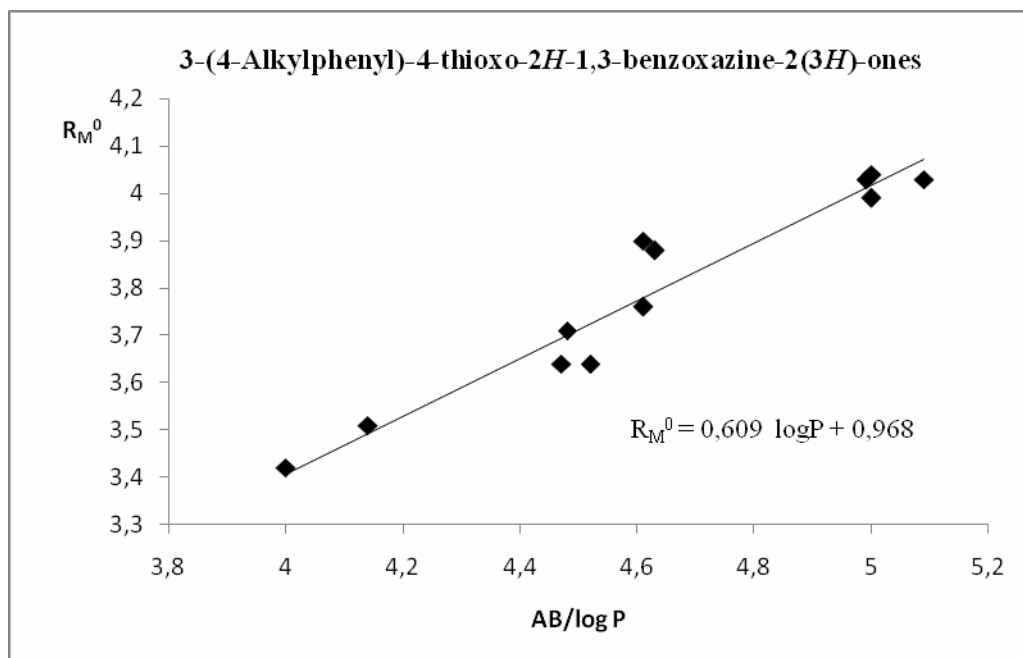


Fig. 1. 3-(4-Alkylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones: correlation between AB/LogP and R_M^0 (eq. used to calculate R_M^0 of the compounds with an unsubstituted acyl moiety and with an unsubstituted phenyl ring).

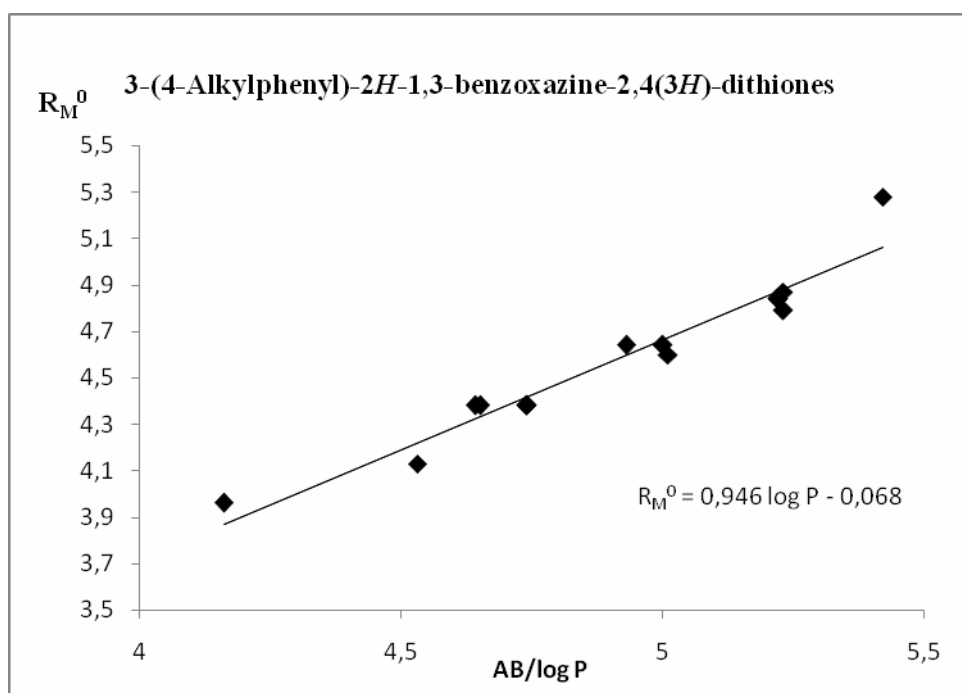


Fig. 2. 3-(4-Alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones: correlation between AB/LogP and R_M^0 (eq. used to calculate R_M^0 of the compounds with an unsubstituted acyl moiety and with an unsubstituted phenyl ring).

Calculated R_M^0 for the standard compounds, calculated average ΔR_M^0 for the substituents and the substituent π constants are presented in Table 6.

Table 6. An investigation of the substituent lipophilicity contribution. Calculated R_M^0 for the standard compounds, calculated average ΔR_M^0 for the substituents and the substituent π constants.

		3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo- 2H-1,3-benzoxazine-2(3H)- ones			3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3- benzoxazine-2,4(3H)-dithiones			
R^1	R^2	AB/LogP	R_M^0	ΔR_M^0	AB/LogP	R_M^0	ΔR_M^0	π
H	isopropyl	2.73	3.24	0.70	4.12	2.78	1.08	1.43

H	<i>sec</i> -butyl	4.22	3.54	1.01	4.60	3.33	1.57	2.10
H	<i>tert</i> -butyl	4.20	3.53	0.98	4.59	3.51	1.53	1.81
6-F	H	2.85	2.70	0.16	3.01	3.13	0.11	0.22
6-Cl	H	3.37	3.02	0.45	3.59	3.33	0.39	0.77
6-Br	H	3.46	3.08	0.58	3.75	3.83	0.90	0.96
7-CH ₃	H	2.99	2.79	0.28	3.38	4.28	0.33	0.60
7-Cl	H	3.37	3.02	0.47	3.59	4.27	0.57	0.73

The lipophilicity contributions (ΔR_M^0) of the substituents were later correlated with the substituent π constants (Fig. 3).

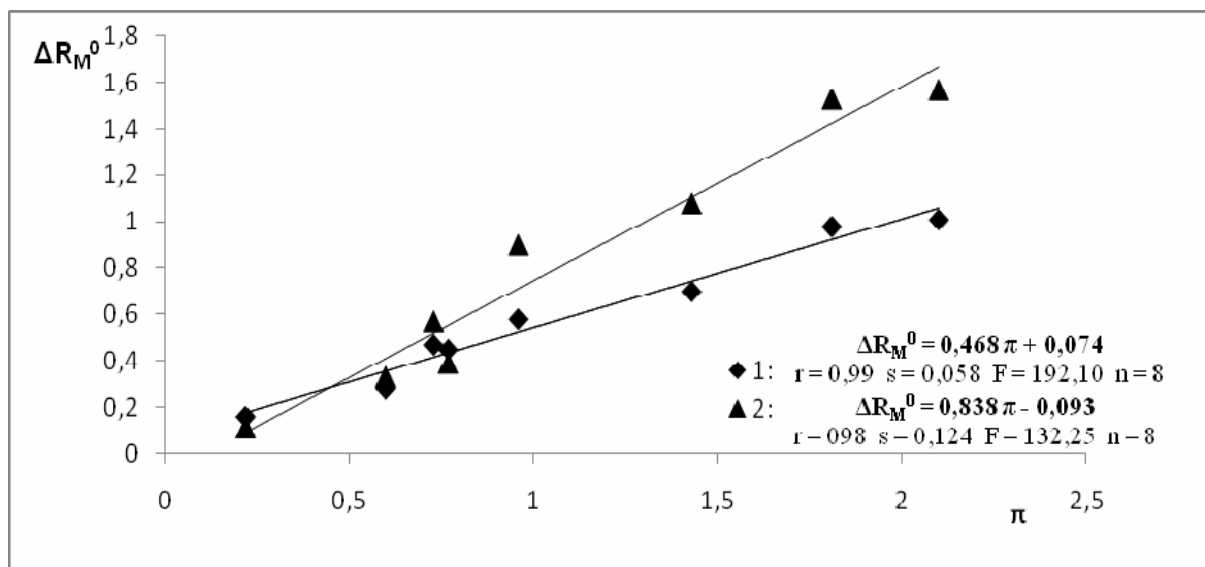


Fig. 3. Correlation between ΔR_M^0 and π constants. 1: 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones, 2: 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones.

In conclusion, 3-(4-alkylphenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 3-(4-alkylphenyl)-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones form a new group of potential antibiotics. Collander equations show that R_M^0 values correlate the best with AB/log*P* values and retention constants R_M^0 were determined by an extrapolation to zero acetone content. A good correlation was obtained between retention constants, R_M^0 and log *P*. The retention constants can be used as the measure of the lipophilicity of the compounds.

References

- [1] WHO: 2009 update tuberculosis facts,
http://www.who.int/tb/publications/2009/factsheet_tb_2009update_dec09.pdf.
- [2] WHO: Essential Drugs Monitor (2000),
<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2248e/s2248e.pdf>.
- [3] *Hartmann, J. Schmitt*, Drug Discovery Today: Technologies **1** (2004) 431-439.
- [4] *B. Testa, P.-A. Carrupt, P. Gaillard, F. Billois, P. Weber* **13** (1996) 335-343.
- [5] *Kulig, K., Malawska, B. J.* Planar Chromatogr. **22** (2009) 141-144.
- [6] Clifford, R. D., Deacon, C. A., Holgate, E. M.. *Ann.Appl.Biol.* **64** (1969) 131.
- [7] *Tetko, I. V., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V. A., Radchenko, E. V., Zefirov, N. S., Makarenko, A. S., Tanchuk, V. Y., Prokopenko, V. V.*, Virtual computational chemistry laboratory - design and description, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, **19** (2005) 453-63.
- [8] VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>. 2005.
- [9] Hansch, C.; Leo, A. Substituent Constants For Correlation Analysis in Chemistry and Biology; John Willey & Sons: New York, 1979.
- [10] Soczewinski, E., Wachtmeister, C. A. *J. Chromatogr.* **7** (1962) 311-320.
- [11] Collander, R. *Acta. Chim. Scand.* **5** (1951) 774-780.
- [12] Collander, R. *Physiol. Plant.* **7** (1954) 420-445.

DOLEŽAL R., WAISSER K., PETRLÍKOVÁ E., KUNEŠ J.,
KUBICOVÁ L., MACHÁČEK M., KAUSTOVÁ J.,
DAHSE H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active
Potential Antituberculotics, *Arch. Pharm. Life Sci.* 2009,
vol. 342, no. 2, p. 113-119.

Full Paper

***N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics**

Rafael Doležal¹, Karel Waisser¹, Eva Petrlíková¹, Jirí Kuneš¹, Lenka Kubicová¹, Miloš Macháček¹, Jarmila Kaustová², and Hans Martin Dahse³

¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

² Department for Diagnostic of Mycobacteria, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Ostrava, Czech Republic

³ Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute, Jena, Germany

A series of 29 new derivatives of *N*-benzylsalicylthioamides was synthesized and the compounds were tested for *in-vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium avium*. The activity was analyzed by quantitative structure-activity relationship (QSAR). Activity increased with increasing lipophilicity and electron donating effect of the substituents in the acyl moiety and decreased with the electrophilic superdelocalizability of the molecules. The most active compounds are more active than isoniazid (INH) and are active against INH-resistant potential pathogenic strains of mycobacterium.

Keywords: Antimycobacterial activity / Antituberculous activity / *N*-Benzylsalicylamides / QSAR / Salicylthioamides

Received: January 29, 2008; accepted: June 19, 2008

DOI 10.1002/ardp.200800032

Introduction

Since 1985, the world is confronted with the return of tuberculosis to Europe and North America. In the developing countries, due to insufficient medical care, hygienic standards, and compliance of the population with the treatment, a number of mycobacterial strains became resistant to modern chemical drugs (i.e., the development of multidrug resistant strains); infection has been often transferred to Europe and North America, since migration towards developed countries is a contemporary feature. The multidrug resistant strains of *M. tuberculosis* coming to Central Europe are mainly from the countries of the former Soviet Union. In addition, the unfavorable state is also being influenced by an increase in AIDS, which is often accompanied by mycobacterial

diseases. The development of new antituberculous agents with high activity is the principal goal of our research. Our group is especially interested in the development of drugs against *M. tuberculosis* and potentially pathogenic strains like *M. avium* and *M. kansasii*. We have recently studied a number of structurally different compounds, such as salicylanilides [1], benzoxazinediones [2], alkoxyphenylcarbamic acids [3], tetrazoles [4, 5], dihydroindolethiones [6], derivatives of benzoxazine with thio group [7], and other heterocycles [8]. The aim of this paper is the synthesis, antimycobacterial evaluation, and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of *N*-benzylsalicylthioamides.

Results

Chemistry

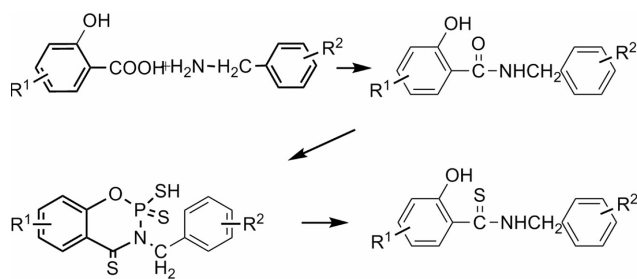
The synthesis of the title compounds is illustrated in Scheme 1. The synthesis of most of the starting *N*-benzylsalicylamides was described in our previous paper [9]. We completed a group of starting *N*-benzylsalicylamides with fourteen new compounds (see Table 1 and Fig. 1).

Correspondence: Karel Waisser, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

E-mail: waisser@faf.cuni.cz

Fax: +42 0495 067166

Abbreviation: multiple linear regression (MLR)



For substituents R¹ and R² see Tables 1 and 3.

Scheme 1. Synthetic pathway to *N*-Benzylsalicylthioamides.

Yields, melting points, and carbonyl frequencies are summarized in Table 2. The synthesis of *N*-benzylsalicylthioamides was performed by the method elaborated in our group and described in a patent [10].

The synthesis consists of the microwave-promoted thionation of the starting *N*-benzylsalicylamides. *N*-Ben-

zylsalicylamides and P₄S₁₀ produce heterocyclic compounds that hydrolyze to *N*-benzylsalicylthioamides (see Fig. 1). The structures are summarized in Table 3 and Fig. 2. The yields, melting points, and carbonyl frequencies are summarized in Table 4. The application of the Willgerodt–Kindler reaction [11] in case of *N*-benzylsalicylamides was unsuccessful. The structure of the compounds was established by IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy and verified by elemental analysis.

Biology

In-vitro antimycobacterial activity of the compounds was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88, and *Mycobacterium kansasii* 6509/96 using the micromethod for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC). All strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Pub-

Table 1. Antimycobacterial activity (minimum inhibition concentrations, MICs) of *N*-benzylsalicylamides **1–15**.

Compound R ¹	R ²	MIC (μmol/L)								
		<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80		<i>M. kansasii</i> 6509/96		
		14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	
1	H	4- <i>tert</i> -but	16	32	32	62.5	62.5	62.5	32	62.5
2	H	3-CF ₃	62.5	62.5	16	16	16	32	62.5	62.5
3	5-Br	3-Br	32	32	32	32	32	62.5	32	32
4	5-Br	4-Br	16	32	16	32	32	32	32	32
5	3,5-Cl ₂	4- <i>tert</i> -but	32	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
6	4-Cl	4-Br	16	32	32	32	32	32	32	32
7	4-CH ₃	H	62.5	125	62.5	125	125	125	125	125
8	4-CH ₃	4-CH ₃	125	500	62.5	250	250	500	250	500
9	4-CH ₃	4-Cl	62.5	125	62.5	125	125	250	250	250
10	4-CH ₃	4- <i>tert</i> -but	32	62.5	16	16	32	32	62.5	62.5
11	4-CH ₃	3-NO ₂	62.5	62.5	32	62.5	62.5	125	62.5	125
12	4-OCH ₃	3-Cl	125	125	62.5	62.5	62.5	125	62.5	125
13^{a)}	3-CH ₃	H	62.5	125	62.5	62.5	62.5	125	62.5	125
14	3-CH ₃	4-Cl	16	32	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
15	3,5-Br ₂	4-CF ₃	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
Isoniazid			1	1	>250	>250	>250	>250	4	4

^{a)} Synthesis in ref. [18].

Table 2. Yield, melting point, and carbonyl frequency of *N*-benzylsalicylamides **1–15**.

Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	ν _{C=O} (cm ⁻¹)	Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	ν _{C=O} (cm ⁻¹)
1	73	130–131	1645	8	81	141–143	1642
2	91	116–118	1636	9	89	162–163	1641
3	51	168–170	1641	10	94	118–120	1650
4	49	154–156	1622	11	84	162–163	1640
5	76	91–92	1641	12	77	105–107	1636
6	75	153–156	1621	14	92	97–99	1643
7	76	105–107	1644	15	85	129–130	1630

Table 3. Antimycobacterial activity (minimum inhibition concentrations, MICs) of *N*-benzylsalicylthioamides **16–45**.

Compound	R ¹	R ²	MIC (μmol/L)							
			<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80		<i>M. kansasii</i> 6509/96	
			14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
16 ^{a)}	H	H	0.5	1	1	2	1	2	2	2
17	H	4-CH ₃	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	1	0.5	1
18	H	4-Cl	1	2	0.5	0.5	1	1	0.5	1
19	H	4-OCH ₃	4	4	0.98	0.98	4	4	4	4
20	H	3,4-Cl ₂	0.49	0.98	0.98	0.98	2	2	2	4
21	H	4-F	0.5	1	1	2	4	4	2	2
22	H	3-CH ₃	0.5	1	0.5	1	2	4	2	2
23	H	4- <i>tert</i> -but	1	2	0.25	0.25	2	4	2	2
24	H	3-Cl	1	1	1	1	1	1	1	1
25	H	3-CF ₃	0.5	1	0.5	1	2	2	2	2
26	5-Br	3,4-Cl ₂	4	4	16	16	16	32	16	16
27	5-Br	3-Br	1	2	8	8	8	8	8	8
28	5-Br	4-Br	1	2	4	4	8	16	4	4
29	5-Cl	H	2	2	8	8	8	8	8	8
30	5-Cl	3,4-Cl ₂	2	4	16	32	32	32	16	16
31	5-Cl	4-F	1	2	8	8	8	16	8	8
32	3,5-Cl ₂	3,4-Cl ₂	16	32	62.5	62.5	32	62.5	32	32
33	3,5-Cl ₂	4- <i>tert</i> -but	32	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
34	4-Cl	4-Br	1	2	2	4	8	16	4	8
35	4-CH ₃	H	0.5	1	1	2	2	2	1	2
36	4-CH ₃	4-CH ₃	0.125	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	1
37	4-CH ₃	4-Cl	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1
38	4-CH ₃	4- <i>tert</i> -but	0.5	0.5	1	2	1	1	1	1
39	4-CH ₃	3-NO ₂	2	2	1	2	2	4	4	4
40	5-OCH ₃	H	4	8	4	4	16	32	16	16
41	4-OCH ₃	H	2	4	4	4	8	8	8	8
42	4-OCH ₃	3-Cl	0.5	1	1	2	2	2	1	1
43	5-NO ₂	4-CH ₃	32	62.5	>125	>125	125	125	125	125
44	3-CH ₃	4-Cl	2	4	1	1	2	2	2	4
45	3,5-Br ₂	4-CF ₃	32	32	32	32	62.5	62.5	62.5	62.5
Isoniazid			1	1	>250	>250	>250	>250	4	4

^{a)} Synthesis in ref. [19].

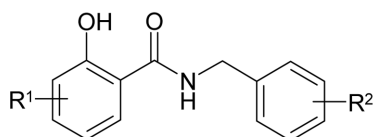


Figure 1. A survey of structures of *N*-benzylsalicylamides. For substituents R¹ and R² see Table 1.

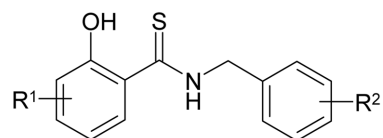


Figure 2. A survey of structures of *N*-benzylthiosalicylamides. For substituents R¹ and R² see Table 3.

lic Health, Prague, with the exception of *M. kansasii* 6509/96, a clinical isolate. Tables 1 and 3 summarize the MICs of the new starting compounds and the title products, respectively. The MICs were determined after incubation

at 37°C for 14 and 21 days. For the sake of comparison, we also included the values of MICs of the standard isoniazid (INH). The method is described in our previous papers [1–9]. The antiproliferative activity and cytotoxicity of some compounds were investigated at the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knöll Institute in Jena. The results are summarized in Table 5. The methods were described in the previous papers [12, 13] and in the experimental part (Section 4) herein.

Calculations

The program HyperChem, Release 7.52, was used to calculate log *P* (octanol / water system), volume, surface, and polarizability of the compounds under study [14]. The program Gaussian 03, Revision C.02, was used for the quantum chemical calculations [15]. All molecular models were computed by the B3LYP/6-31G* method. The obtained wave-function data were processed in a self-

Table 4. Yield, melting point, and frequency of hydroxyl vibration of *N*-benzylsalicylthioamides **17–45**.

Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)	Compound	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)
17	34	73–74	3311	32	19	91–93	3355
18	17	101–102	3324	33	31	120–122	3338
19	43	92–93	3332	34	49	106–108	3320
20	41	96–97	3301	35	45	91–93	3308
21	34	64–65	3316	36	81	99–100	3313
22	42	85–86	3302	37	45	131–133	3312
23	80	89–90	3312	38	52	121–122	3327
24	51	96–97	3305	39	10	99–100	3315
25	40	29–30	3311	40	37	94–95	3273
26	37	117–118	3365	41	29	74–75	3377
27	32	136–137	3366	42	49	73–74	3376
28	38	131–132	3309	43	25	125–127	3324
29	55	109–110	3311	44	42	94–95	3376
30	34	133–134	3291	45	5	130–132	3347
31	40	112–113	3363				

developed program to compute quantum chemical descriptors. The complete set of 177 molecular descriptors consisted of 166 different quantum chemical descriptors (*e.g.*, superdelocalizabilities, indices of frontier electron densities, Mulliken charges, *etc.*), Hammett constants, Hansch constants, and several chemical shifts from ¹³C-NMR spectra. A detailed review of quantum chemical descriptors is available in the literature [16]. The structure-activity relationships were searched for by the program STATOO (R. Doležal). The program STATOO is based on multiple linear regression (MLR). Its selection algorithm searches the best parameters in correlation equations. Statistical evaluation is given under every equation. The symbols are usual, q^2 is the cross-validated correlation coefficient determined by leave-one-out procedure.

Discussion

In general, the synthesized compounds possess *in-vitro* activities against all tested mycobacterial strains, which are better than or comparable to that of INH (Tables 1 and 3). The values of MICs are generally within the range from 0.125 to 125 $\mu\text{mol/L}$, most often between 0.5 and 4 $\mu\text{mol/L}$. The most active compounds, **17** and **36**, were more active against *M. tuberculosis* 331/88 than INH. All new compounds, again, were more effective against *M. kansasii* 235/80 and *M. avium* 330/88 than INH. The replacement of an oxo group in the starting *N*-benzylsalicylamides for a thioxo group increases the antimycobacterial activity of the title compounds against all mycobacterial strains. The increase in antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* (incubation 14 d) by replacing car-

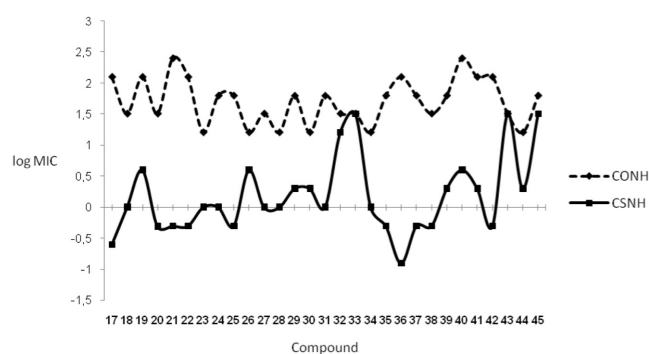


Figure 3. Comparison of antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* (log MIC after 14 d incubation) of *N*-benzylsalicylthioamides **17–45** with that of *N*-benzylsalicylamides. The values of the activity of corresponding *N*-benzylsalicylamides not presented in this paper were culled from Ref. [9].

bonyl oxygen for sulfur is demonstrated in Fig. 3. Interestingly, the antimycobacterial activities of *N*-benzylsalicylamides do not correlate significantly with those of the corresponding *N*-benzylsalicylthioamides. The newly synthesized compounds form a new promising group of antimycobacterials with a broad spectrum of antimycobacterial activity. Two most active compounds, **17** and **36**, were chosen for preclinical testing. Antiproliferative activity and cytotoxicity of compounds **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **23**, and **36** were investigated (Table 5). Unfortunately, the compounds under study are cytotoxic.

The set of 177 descriptors was used for QSAR study. The best three-parameter QSAR models were searched for using MLR technique in the STATOO program. The most important parameters were: $\log P$ – partition coefficient for system octanol / water; σ_{R1} – Hammett constants of substituents R¹ in the acyl moiety; SumS_e^w – sum of

Table 5. Antiproliferative activity and cytotoxicity.

Compound	Antiproliferative activity		Cytotoxicity
	Huvec GI ₅₀ (μg/mL)	K-562 GI ₅₀ (μg/mL)	HeLa CC ₅₀ /CC ₁₀ (μg/mL)
16	9.2	8.7	11.1 / 3.9
17	10.0	9.9	12.5 / 5.7
18	5.9	5.2	5.5 / 2.7
19	19.2	14.8	21.6 / 9.2
20	5.9	5.2	5.6 / 2.1
23	4.6	3.5	3.7 / 1.7
36	12.5	13.0	12.4 / 4.5
INH	>50.0	>50.0	>50.0 / 50.0
ETH	37.2	50.0	40.8 / 40.2

weighted electrophilic superdelocalizabilities for all atoms in the molecule (calculated from the output of the Gaussian); S_n3' – nucleophilic superdelocalizability on carbon 3 on the benzyl (calculated from output of the Gaussian); charge1 – Mulliken charge on carbon 1 in the acyl moiety (calculated from output of the Gaussian); S_eH – electrophilic superdelocalizability of hydrogen atoms in the thioamide group; $Sumf_e$ – sum of indices of electrophilic frontier electron density of all atoms in the molecules (calculated from output of the Gaussian); π_{R2} – Hansch constant of substituents R^2 on the benzyl; chargeH – Mulliken charge on the hydrogen atom in the thioamide group. The program STATOO determined the statistically most significant correlation equations (see Eqs. 1–8). In accordance with the correlations found, the antimycobacterial activities are always enhanced by electron donating substituents R^1 in the acyl moiety (i.e., when σ_{R1} is negative). Lipophilicity ($\log P$ or π_{R2}) mostly increases the activity. Other significant descriptors correspond with the local properties of certain atoms (i.e., S_n3' , chargeH, charge1 and S_eH) or express the overall molecular properties (i.e., $SumS_e^w$ and $Sumf_e$). A higher nucleophilic superdelocalizability on carbon 3' (S_n3') increases the activity against *M. avium* Eq. (3) and Eq. (4). Electrophilic superdelocalizability (S_eH) and Mulliken charge (chargeH) on the hydrogen atom of the thioamide group are both statistically associated with Hammett constant (σ_{R1}), and therefore, when they are lower, they also enhance the activity in the same way Eqs. (6 and 7). A lower Mulliken charge on carbon 1 (charge1) enhances the activity Eq. (6). The sum of weighted electrophilic superdelocalizabilities ($SumS_e^w$), present in most equations, should be lower in order to increase the activity. The sum of indices of electrophilic electron densities ($Sumf_e$) increases the activity when it is higher Eq. (6). All presented QSAR models show acceptable statistical significance suggesting a high importance of lipophilic and electronic properties

of N-benzylsalicylthioamides for their antimycobacterial activities.

$$\log MIC_{M.tuberc.}^{14d} = -0.478 (\pm 0.107)\log P + 1.551 (\pm 0.206)\sigma_{R1} + 0.048 (\pm 0.009)SumS_e^w - 2.46 (\pm 0.646) \quad \text{Eq. (1)}$$

$$r^2 = 0.811 \quad q^2 = 0.758 \quad s = 0.282 \quad F = 37.407 \quad n = 30$$

$$\log MIC_{M.tuberc.}^{21d} = -0.491 (\pm 0.097)\log P + 1.581 (\pm 0.187)\sigma_{R1} + 0.043 (\pm 0.008)SumS_e^w - 1.725 (\pm 0.586) \quad \text{Eq. (2)}$$

$$r^2 = 0.828 \quad q^2 = 0.776 \quad s = 0.256 \quad F = 41.595 \quad n = 30$$

$$\log MIC_{M.avi.}^{14d} = 1.819 (\pm 0.163)\sigma_{R1} - 0.013 (\pm 0.002)S_n3' + 0.043 (\pm 0.007)SumS_e^w + 2.118 (\pm 0.765) \quad \text{Eq. (3)}$$

$$r^2 = 0.913 \quad q^2 = 0.88 \quad s = 0.219 \quad F = 86.974 \quad n = 29$$

$$\log MIC_{M.avi.}^{21d} = 1.611 (\pm 0.19)\sigma_{R1} - 0.012 (\pm 0.002)S_n3' + 0.041 (\pm 0.008)SumS_e^w + 2.101 (\pm 0.887) \quad \text{Eq. (4)}$$

$$r^2 = 0.864 \quad q^2 = 0.819 \quad s = 0.254 \quad F = 52.98 \quad n = 29$$

$$\log MIC_{M.kan.}^{14d} = -0.472 (\pm 0.106)\log P + 1.948 (\pm 0.204)\sigma_{R1} + 0.04 (\pm 0.009)SumS_e^w - 1.27 (\pm 0.64) \quad \text{Eq. (5)}$$

$$r^2 = 0.846 \quad q^2 = 0.796 \quad s = 0.28 \quad F = 47.615 \quad n = 30$$

$$\log MIC_{M.kan.}^{21d} = 39.247 (\pm 10.225)\text{charge1} + 98.36 (\pm 9.011)S_eH - 3.271 (\pm 0.43)Sumf_e + 13.978 (\pm 2.456) \quad \text{Eq. (6)}$$

$$r^2 = 0.886 \quad q^2 = 0.856 \quad s = 0.236 \quad F = 67.402 \quad n = 30$$

$$\log MIC_{M.kan.cl.}^{14d} = -0.486 (\pm 0.103)\pi_{R2} + 177.82 (\pm 18.757)\text{chargeH} + 0.046 (\pm 0.007)SumS_e^w - 64.828 (\pm 6.336) \quad \text{Eq. (7)}$$

$$r^2 = 0.869 \quad q^2 = 0.811 \quad s = 0.249 \quad F = 57.257 \quad n = 30$$

$$\log MIC_{M.kan.cl.}^{21d} = -0.401 (\pm 0.092)\log P + 1.731 (\pm 0.177)\sigma_{R1} + 0.034 (\pm 0.008)SumS_e^w - 1.006 (\pm 0.556) \quad \text{Eq. (8)}$$

$$r^2 = 0.852 \quad q^2 = 0.791 \quad s = 0.243 \quad F = 50.012 \quad n = 30$$

The most active compound can be obtained by a synthesis of four compounds if the Topliss approach [17] is used.

The eight above-mentioned MLR QSAR models represent the best three-parameter linear relationships found in 177 investigated descriptors. Generally, the antimycobacterial activities of N-benzylsalicylthioamides against *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, and *M. kansasii cl.* are enhanced by electron-donating as well as lipophilic substituents at the acyl moiety of N-benzylsalicylthioamides. It seems that electronic properties of the substituents in

the acyl moiety of *N*-benzylsalicylthioamides induce more distinctive changes in the activity than the substituents on the benzyl. For further development of *N*-benzylsalicylthioamides, we suggest to introduce potent electron-donating substituents (*e.g.*, $-N(CH_3)_2$) into the acyl moiety and to keep lipophilic substituents in the amine moiety. Contrary to isosteres of salicylanilides, the antimycobacterial activity of which has been recently found to be enhanced by electron-withdrawing substituents (paper to be published), the *N*-benzylsalicylthioamides may act with a different mechanism. We suppose that increasing the electron density on the sulfur of the CSNH group is the key factor for increasing the antimycobacterial activity.

This study is a part of the research project number MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

The authors have declared no conflict of interest.

Experimental

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or in $CHCl_3$ solutions on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm^{-1} . The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) operating at 300 MHz for 1H and 75 MHz for ^{13}C in d_6 -DMSO. Chemical shifts were recorded as δ values in ppm, and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for 1H and 77.0 for ^{13}C). The coupling constants J are given in Hz. Elemental analyses were done on a CHNS-O CE FISON EA1110 elemental analyzer (Fisons Instruments, Italy). Analyses of the C, H, N, and S contents were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. To check the purity of the products, TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane / acetone 3 : 1. Interpretation of NMR spectra and values of elemental analyses are in the attachment to the journal.

General procedure for preparation of *N*-benzylsalicylamides 1–15

A suspension of substituted salicylic acid (0.02 mol) and substituted benzylamine (0.02 mol) in chlorobenzene (100 mL) was heated under reflux in the presence of PCl_3 (0.01 mol) for 3 h. The reaction mixture was filtered while hot, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product was recrystallized from ethanol / water (yields were in the range of 49–95%).

General procedure for the preparation of *N*-benzylsalicylthioamides 16–45

A suspension of starting *N*-benzylsalicylamide (0.005 mol) and an equivalent amount of P_4S_{10} in pyridine (10 mL) was heated

under reflux for 45 min in a microwave reactor. Without isolation of the intermediary product, the reaction mixture was added to a mixture of toluene (150 mL) and dilute HCl (150 mL, pH 1), and refluxed under vigorous stirring for 3 h. The toluene layer was separated, toluene was evaporated, and the residue was chromatographed (silica gel, toluene). The product was recrystallized from ethanol / water (yields were in the range of 17–81%).

Tests for cytotoxicity and antiproliferative activity

Cells and culture conditions

Cells / cell-culture medium: A: Huvec (ATCC CRL-1730) / DMEM (Cambrex 12-614F; Cambrex Bio Science at Biotech A.S., Prague, Czech Republic); B: K-562 (DSM ACC 10) / RPMI 1640 (Cambrex 12-167F); C: HeLa (DSM ACC 57) / RPMI 1640 (Cambrex 12-167F).

Cells were grown in the appropriate cell-culture medium supplemented with 10 mL/L ultraglutamine I (Cambrex 17-605E/U1), 500 μ L/L gentamicin sulfate (Cambrex 17-518Z), and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA A15-144) at 37°C in high-density polyethylene flasks (NUNC 156340; Fisher Scientific spol. s.r.o., Pradubice, Czech Republic).

Antiproliferative assay

The test substances were dissolved in DMSO before being diluted in DMEM / Dulbecco's modified Eagle medium. The adherent cells were harvested at the logarithmic growth phase after soft trypsinization, using 0.25% trypsin in PBS containing 0.02% EDTA (Biochrom KG L2163; Biochrom, Berlin, Germany). For each experiment approximately 10 000 cells were seeded with 0.1 mL culture medium per well of the 96-well microplates (NUNC 167008).

Cytotoxic assay

For the cytotoxic assay, HeLa cells were 48 hours pre-incubated without the test substances. The dilutions of the compounds were carried out carefully on the subconfluent monolayers of HeLa cells after the pre-incubation time.

Condition of incubation

The cells were incubated with dilutions of the test substances for 72 hours at 37°C in a humidified atmosphere and 5% CO_2 .

Method of evaluation

To estimate the influence of chemical compounds on cell proliferation of K-562, we determine the numbers of viable cells present in multi-well plates via CellTiter-Blue1 assay. It uses the indicator dye resazurin to measure the metabolic capacity of cells as the indicator of cell viability. Viable cells of untreated control retain the ability to reduce resazurin into resorufin, which is highly fluorescent. Non-viable cells rapidly lose metabolic capacity, do not reduce the indicator dye, and thus do not generate a fluorescent signal. Under our experimental conditions, the signal from the CellTiter-Blue1 reagent is proportional to the number of viable cells.

The adherent Huvec and HeLa cells were fixed by glutaraldehyde and stained with a 0.05% solution of methylene blue for 15 min. After gently washing, the stain was eluted with 0.2 mL of 0.33 N HCl in the wells. The optical densities were measured at 660 nm in SUNRISE microplate reader (TECAN, Switzerland).

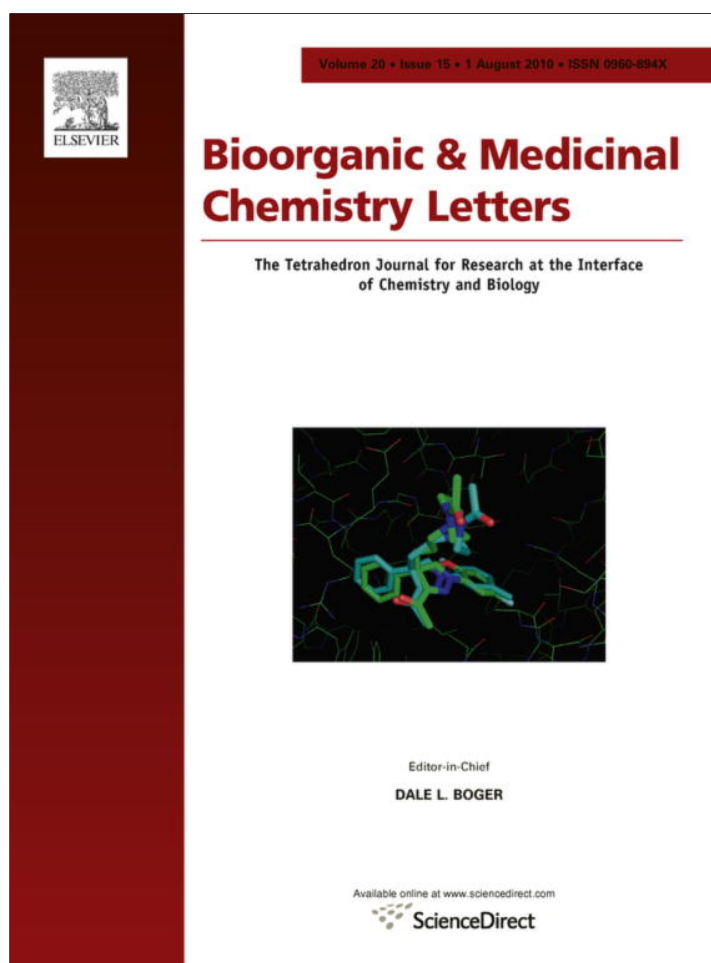
The GI₅₀ and CC₅₀ values were defined as the value at the intersection of the dose response curve with the 50% line, compared to untreated control. These comparisons of the different values were performed with the software Magellan (TECAN).

References

- [1] K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, *et al.*, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, 339, 616–620.
- [2] K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, *et al.*, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, 340, 264–267.
- [3] K. Waisser, R. Doležal, K. Palát, J. Čižmárik, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 21–24.
- [4] K. Waisser, J. Adamec, R. Doležal, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 195–197.
- [5] J. Adamec, K. Waisser, J. Kuneš, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 385–389.
- [6] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 25–26.
- [7] K. Waisser, J. Matyk, J. Kuneš, R. Doležal, *et al.*, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2008**, 341, 800–803.
- [8] J. Matyk, K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, *et al.*, *Farmaco* **2005**, 60, 399–408.
- [9] K. Waisser, M. Perina, V. Klimešová, J. Kaustová, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2003**, 68, 1275–1294.
- [10] L. Kubicová, M. Sedlák, V. Chobot, M. Macháček, CZ Pat. 298498. **2007**.
- [11] K. Aghapoor, H. R. Darabi, K. Tabar-Heydar, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2002**, 177, 1183–1187.
- [12] H. M. Dahse, B. Schlegel, U. Gräfe, *Pharmazie* **2001**, 56, 489–461.
- [13] H. M. Dahse, U. Möllmann, K. Waisser, K. Palát, *et al.*, *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2002**, 27–28, 29–33.
- [14] Hyperchem Release 7.52 for Windows Molecular Modeling System. Hypercube, Ontario, Canada.
- [15] Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, *et al.*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [16] M. Karelson, V. S. Lobanov, A. R. Katritzky, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 1027–1043.
- [17] J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1006–1011.
- [18] W. Baker, B. Gilbert, W. D. Ollis, T. S. Zealley, *J. Chem. Soc.* **1951**, 209–213.
- [19] S. Scheibye, B. S. Pedersen, S. O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, 87, 299–306.

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUCHTA, V., JÍLEK, P., VEJSOVÁ, M.: *N*-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with Promising Antimycotic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, vol. 20, p. 4535–4538.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

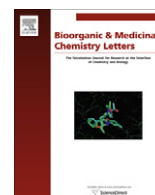
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

N-Benzylsalicylthioamides as novel compounds with promising antimycotic activity

Eva Petrlíková^{a,*}, Karel Waisser^a, Vladimír Buchta^{b,c}, Petr Jílek^c, Marcela Vejsová^c^a Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic^b Department of Clinical Microbiology, University Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic^c Department of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2010

Revised 3 June 2010

Accepted 4 June 2010

Available online 11 June 2010

Keywords:

N-Benzylsalicylthioamides

Antifungal activity

QSAR

Lipophilicity

ABSTRACT

The in vitro biological activity of *N*-benzylsalicylthioamides was evaluated against eight fungal strains by the broth microdilution method and the results were compared with those obtained with fluconazole. The compounds exhibited an in vitro antifungal activity against the fluconazole-susceptible as well as the fluconazole-resistant fungal strains. The biological activity was analyzed by quantitative structure–activity relationship (QSAR).

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Fungal infections cause a wide range of diseases in humans. They are caused by microscopic fungi that can be normally found in the nature and human beings are constantly exposed to them. The establishment of a mycotic infection usually depends on the pathogenicity of a fungus and on the host resistance.¹ It is known that almost everyone comes in contact with fungi during a life period. However, the development of serious infections is largely associated with immunocompromised persons, such as HIV, elderly, cancer patients, and transplant recipients.^{2–4} The incidence of systemic mycoses has increased over the last years.⁵ The facts that both mammalian and fungal cells are eukaryotic and that their cell membranes contain structurally similar sterols (ergosterol in fungi vs cholesterol in mammals)⁶ can be also connected with some problems in management, which can explain some serious side effects of commonly used antifungal drugs. Whereas there are many antimycotics with different chemical structures used in the therapy of superficial mycoses, that is, mycoses that infect the keratinized layers of the skin, hair, and nails, there are less efficient and specific drugs for the treatment of systemic mycoses.⁷ Another problem is a growing number of opportunistic pathogens with increased resistance to antifungals, especially in the setting of immunocompromised patients.^{8,9}

All these problems need a solution and the development of new antifungal compounds with a better effectiveness and a lower toxicity is the subject of scientific research.

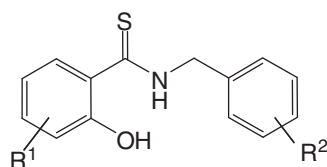
Waisser (1998) has demonstrated that there can be some correlations between the antimycotic and antimycobacterial activities, and having found that *N*-benzylsalicylthioamides belong to the group of very active compounds against tuberculosis,¹⁰ we tried to investigate their activities against some fungal strains. The hypothesis that these compounds can show some significant biological activity was also based on the knowledge of some drugs with a thiocarbonyl functional group that have already been introduced into practice, for example, tolnaphtate that is believed to inhibit microsomal squalene epoxidase from *Candida albicans*.¹¹ Also the antifungal activity of related thiosalicylanilides is known. Wagner et al. synthesized^{12,13} a series of thiosalicylanilides, tested their antifungal activity and found some structure–activity relationship (SAR).¹⁴

Our work is focused on *N*-benzylsalicylthioamides prepared by a new method of synthesis.¹⁰ The goal of this Letter was to study the in vitro antifungal activity of these compounds and to find some quantitative correlations between the structure and the biological activity (QSAR).

N-Benzylsalicylthioamides were prepared by microwave-assisted thionation of starting *N*-benzylsalicylamides. This synthesis, the analytical data and the evaluation of the antimycobacterial activity of these derivatives are described in full details in our previous paper.¹⁰ An overview of the compounds under study and their calculated log *P* are summarized in Scheme 1.

In this study, the culture medium RPMI 1640 (Sevapharma, Prague, Czech Republic) buffered to pH 7.0 with 0.165 M of 3-morpholino-propane-1-sulfonic acid was used to study the antifungal

* Corresponding author. Tel.: +420 495067335; fax: +420 465067166.
E-mail address: Eva.Petrlikova@faf.cuni.cz (E. Petrlíková).



Comp.	R ¹	R ²	logP	pK _a	Comp.	R ¹	R ²	logP	pK _a
1	H	3,4-Cl ₂	4.62	7.5	12	H	3-CH ₃	3.99	7.5
2	5-Br	4-Br	5.16	6.9	13	4-CH ₃	H	3.99	7.7
3	5-Cl	4-F	4.22	7.0	14	4-CH ₃	4-CH ₃	4.48	7.7
4	5-Br	3-Br	5.16	6.9	15	4-OCH ₃	H	3.38	7.3
5	5-Cl	3,4-Cl ₂	5.18	6.9	16	5-NO ₂	4-CH ₃	2.73	4.5
6	5-Br	3,4-Cl ₂	5.45	6.9	17	3-CH ₃	4-Cl	4.55	8.0
7	4-Cl	4-Br	4.89	6.7	18	H	3-Cl	4.06	7.6
8	H	4- <i>Tert</i> -butyl	5.21	7.5	19	4-OCH ₃	3-Cl	3.94	7.3
9	5-Cl	H	4.06	7.0	20	4-CH ₃	4-Cl	4.55	7.7
10	H	4-CH ₃	3.99	7.5	21	4-CH ₃	4- <i>Tert</i> -butyl	5.70	7.7
11	H	4-F	3.66	7.6					

Scheme 1. Overview of compounds under study, calculated log *P* and pK_a.

Table 1
Antifungal activity

Strains	Compounds (MIC (μmol/L) 24/48 h)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Flu
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	15.62/ 31.25	15.62/ 31.25	31.25/ 125	15.62/ 31.25	31.25/ 31.25	15.62/ 31.25	15.62/ 31.25	>500/ >500	62.5/ 125	62.5/ 125	62.5/ 125	1(±1)/ 2(±1)
<i>Candida tropicalis</i> 156	31.25/ 31.25	31.25/ 31.25	62.5/ 125	15.62/ 62.5	31.25/ 62.5	31.25/ 31.25	31.25/ 31.25	>500/ >500	62.5/ 125	125/125	125/250	3(±1)/ 5(±2)
<i>Candida krusei</i> E28	15.62/ 31.25	3.9/ 15.62	7.81/ 15.62	3.9/7.81	3.9/ 15.62	7.81/ 15.62	3.9/ 15.62	>500/ >500	15.62/ 31.25	62.5/ 125	62.5/ 125	>50/>50
<i>Candida glabrata</i> 20/I	31.25/ 31.25	31.25/ 125	62.5/ 125	7.81/ 31.25	31.25/ 31.25	31.25/ 62.5	31.25/ 31.25	>500/ >500	15.62/ 62.5	125/125	125/250	22(±6)/ >50
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	15.62/ 15.62	3.9/7.81	7.81/ 15.62	15.62/ 31.25	3.9/7.81	3.9/7.81	7.81/ 7.81	250/250	31.25/ 31.25	31.25/ 62.5	31.25/ 62.5	4(±2)/ 9(±3)
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	15.62/ 31.25	15.62/ 15.62	31.25/ 15.62	7.81/ 15.62	3.9/ 15.62	7.81/ 7.81	7.81/ 7.81	250/ >500	31.25/ 31.25	125/250	62.5/ 62.5	>50/>50
<i>Absidia corymbifera</i> 272	7.81/ 15.62	3.9/3.9	15.62/ 15.62	3.9/3.9	3.9/7.81	3.9/3.9	0.98/ 1.95	15.62/ 62.5	15.62/ 15.62	15.62/ 31.25	15.62/ 31.25	>50/>50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445*	7.81/ 15.62	15.62/ 31.25	15.62/ 15.62	1.95/ 1.95	0.98/ 0.98	0.98/ 0.98	0.98/ 1.95	15.62/ 15.62	1.95/3.9	31.25/ 15.62	7.81/ 31.25	17(±6)/ 26(±1)

Flu: fluconazole (standard).

* MIC evaluated after 72 and 120 h.

activity. The organisms examined included the following strains: *C. albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272, and *Trichophyton mentagrophytes* 445. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C (72 and 120 h of incubation in the case of *T. mentagrophytes*) and the value of MIC of fluconazole was included for the sake of comparison. The values of antifungal activity are summarized in Tables 1 and 2.

5-Bromo-*N*-(4-brombenzyl)salicylthioamide with the activity within the range of 0.98–31.25 μmol/L seems to be the most prospective compound. But also the compounds **2**, **4–6** exhibited high activity in the range of 0.98–62.5 μmol/L. In most cases, the activities of these compounds are comparable to or better than that of fluconazole. Regrettably, none of the compounds has shown a bet-

ter antifungal activity against *C. albicans* and *C. tropicalis* than fluconazole. However, we must be careful before making any definitive conclusions because primary resistance or decreased susceptibility to fluconazole should be taken into consideration in the case of evaluation of the antifungal potential of the compounds tested against *A. fumigatus*, *A. corymbifera*, *C. krusei*, and *C. glabrata*.

The SPARC 4.5 program was used to calculate pK_a values (Scheme 1). The calculated pK_a values of the most active compounds (**2**, **4–7**) were found in the range of 6.7–6.9 and considering the incubation conditions (35 °C, pH 7.00) it would be expected to make 54–66% of the deprotonated form of the active compounds. The pK_a range 6.7–6.9 seems to be the optimum for the antifungal activity since the less active compounds had lower or higher calculated pK_a than the more active antifungal derivatives.

Table 2
Antifungal activity

Strains	Compounds (MIC (μmol/L) 24/48 h)										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Flu
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	125/250	62.5/125	125/250	62.5/250	500/250	62.5/125	125/125	125/250	>500/ >500	>500/ >500	1(±1)/2(±1)
<i>Candida tropicalis</i> 156	125/250	125/250	125/500	250/250	>500/ >500	125/250	125/125	125/250	>500/ >500	>500/ >500	3(±1)/5(±2)
<i>Candida krusei</i> E28	125/250	62.5/125	62.5/125	250/250	>500/ >500	>500/ >500	62.5/125	125/125	>500/ >500	>500/ >500	>50/>50
<i>Candida glabrata</i> 20/I	125/250	125/250	125/500	500/500	>500/ >500	>500/ >500	125/250	250/500	>500/ >500	>500/ >500	22(±6)/>50
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	31.25/62.5	62.5/62.5	31.25/62.5	250/250	500/500	62.5/62.5	31.25/31.25	31.25/62.5	>500/ >500	>500/ >500	4(±2)/9(±3)
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	62.5/62.5	62.5/125	125/500	250/500	500/500	62.5/125	62.5/62.5	62.5/125	>500/ >500	>500/ >500	>50/>50
<i>Absidia corymbifera</i> 272	62.5/15.62	7.81/31.25	7.81/31.25	62.5/250	500/500	31.25/31.25	31.25/31.25	7.81/7.81	>500/ >500	>500/ >500	>50/>50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445*	15.62/15.62	31.25/31.25	15.62/15.62	62.5/62.5	62.5/62.5	15.62/15.62	7.81/15.62	15.62/15.62	>500/ >500	>500/ >500	17(±6)/26(±1)

Flu: fluconazole (standard).

* MIC evaluated after 72 and 120 h.

Table 3
Results of QSAR calculations

Eq.	Strain; incubation time	Results of QSAR calculations
1	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 24 h	Log MIC = -0.440 (±0.109) log P -0.145 (±0.161) I +0.021 (±0.233) σ +3.699 (±0.422) R = 0.83 s = 0.259 F = 10.45 n = 18
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 48 h	Log MIC = -0.392 (±0.118) log P -0.135 (±0.131) I -0.267 (±0.304) σ +3.801(±0.497) R = 0.87 s = 0.200 F = 13.91 n = 17
3	<i>Candida tropicalis</i> 156; 24 h	Log MIC = -0.318 (±0.086) log P -0.097 (±0.097) I -0.476 (±0.224) σ +3.360 (±0.365) R = 0.92 s = 0.148 F = 24.18 n = 17
4	<i>Candida tropicalis</i> 156; 48 h	Log MIC = -0.292 (±0.155) log P -0.153 (±0.173) I -0.478 (±0.401) σ +3.498 (±0.655) R = 0.80 s = 0.264 F = 7.71 n = 17
5	<i>Candida krusei</i> E28; 24 h	Log MIC = -0.444 (±0.127) log P -0.190 (±0.144) I -1.232 (±0.346) σ +3.588 (±0.537) R = 0.95 s = 0.210 F = 41.07 n = 16
6	<i>Candida krusei</i> E28; 48 h	Log MIC = -0.331 (±0.113) log P -0.249 (±0.129) I -0.913 (±0.309) σ +3.418 (±0.480) R = 0.95 s = 0.188 F = 33.19 n = 16
7	<i>Candida glabrata</i> 20/I; 24 h	Log MIC = -0.230 (±0.149) log P -0.090 (±0.170) I -1.088 (±0.407) σ +2.998 (±0.632) R = 0.88 s = 0.247 F = 14.26 n = 16
8	<i>Candida glabrata</i> 20/I; 48 h	Log MIC = -0.244 (±0.183) log P -0.116 (±0.208) I -0.798 (±0.499) σ +3.327 (±0.776) R = 0.80 s = 0.304 F = 7.15 n = 16

The Hansch approach was carried out to study the relationship between the structure of *N*-benzylsalicylthioamides and their antifungal activity. The QSAR study included the results obtained both after 24 and 48 h of incubation (72/120 h for *T. mentagrophytes*). All regression calculations (Eqs. 1–16 in Tables 3 and 4) were set up using the MULTIREG program for Microsoft Excel. The logarithms of

the partition coefficient (log *P*) were calculated using ChemBio-Draw 11.0 and the values are presented in Scheme 1, the biological activity data in Tables 1 and 2 and the values of σ Hammett constants were taken from the literature.¹⁵

The parameters with the greatest influence on the biological activity include lipophilicity (log *P*), the indicator parameter *I* for

Table 4
Results of QSAR calculations

Eq.	Strain; incubation time	Results of QSAR calculations
9	<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 24 h	Log MIC = -0.386 (±0.146) log P -0.560 (±0.218) I -0.174 (±0.360) σ +3.500 (±0.599) R = 0.80 s = 0.400 F = 8.69 n = 19
10	<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 48 h	Log MIC = -0.335 (±0.118) log P -0.550 (±0.176) I -0.140 (±0.290) σ +3.427 (±0.484) R = 0.83 s = 0.323 F = 11.35 n = 19
11	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 24 h	Log MIC = -0.394 (±0.114) log P -0.577 (±0.170) I -0.277 (±0.281) σ +3.749 (±0.468) R = 0.87 s = 0.313 F = 15.62 n = 19
12	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 48 h	Log MIC = -0.403 (±0.126) log P -0.525 (±0.186) I -0.594 (±0.270) σ +3.925 (±0.488) R = 0.90 s = 0.299 F = 18.85 n = 18
13	<i>Absidia corymbifera</i> 272; 24 h	Log MIC = -0.582 (±0.133) log P -0.321 (±0.198) I +0.452 (±0.327) σ +3.798 (±0.545) R = 0.83 s = 0.364 F = 10.92 n = 19
14	<i>Absidia corymbifera</i> 272; 48 h	Log MIC = -0.480 (±0.132) log P -0.524 (±0.197) I +0.091 (±0.325) σ +3.699 (±0.542) R = 0.84 s = 0.362 F = 11.68 n = 19
15	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445; 72 h	Log MIC = -0.375 (±0.136) log P -0.488 (±0.202) I -0.404 (±0.333) σ +2.945 (±0.555) R = 0.81 s = 0.371 F = 9.74 n = 19
16	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445; 120 h	Log MIC = -0.453 (±0.141) log P -0.212 (±0.210) I -0.459 (±0.347) σ +3.213 (±0.577) R = 0.77 s = 0.386 F = 7.34 n = 19

Table 5
Comparison between the evaluated and calculated antifungal activity of *N*-benzyl-5-methoxysalicylthioamide

	Log MIC/log MIC calculated; 24 h ^a	Log MIC/log MIC calculated; 48 h ^b
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859	2.10/2.21	2.40/2.48
<i>Candida tropicalis</i> 156	2.40/2.29	2.40/2.51
<i>Candida krusei</i> E28	2.40/2.09	2.40/2.30
<i>Candida glabrata</i> 20/1	2.40/2.22	2.40/2.50
<i>Trichosporon asahii</i> 1188	2.10/2.20	2.40/2.29
<i>Aspergillus fumigatus</i> 231	2.40/2.42	2.40/2.56
<i>Absidia corymbifera</i> 272	1.49/1.83	2.10/2.08
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445	1.80/1.68	1.80/1.68

^a 72 h.

^b 120 h in the case of *Trichophyton mentagrophytes*.

halogens as substituents, and the substituent constants of polarity σ , expressed with regard to the carbonyl group of the acyl moiety.

The lipophilicity (log *P*) used for the QSAR calculations was confirmed by the correlation between the calculated log *P* and R_M values obtained using thin-layer chromatography on silica gel impregnated with trioctadecylsilane (See Supplementary data).

Equations 1–16 (Tables 3 and 4) show that the biological activity of the substances increases with lipophilicity, with the presence of halogens, and mostly with the increasing values of constants σ . The influence of halogens on the activity could be explained by their electron-withdrawing effect.

The antifungal activity of *N*-benzyl-5-methoxysalicylthioamide (log *P* 3.38, pK_a 7.8) was additionally evaluated to verify the QSAR calculations. The logarithms of measured and calculated antifungal activity against all examined strains (both 24 and 48 h incubation) were compared and no big differences were found between the evaluated and calculated log MIC (Table 5).

In conclusion, *N*-benzylsalicylthioamides form a new group with a promising antimycotic activity, and the possibility of how to obtain the efficient antifungal compounds is to ensure their optimal lipophilicity and pK_a .

Acknowledgments

This study is a part of the research project number MSM-0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

We are thankful to Ida Dufková for assisting in biological testing.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.023.

References and notes

- Romani, L.; Bistoni, F.; Puccetti, P. *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 508.
- Wanke, B.; Lazera, M. d. S.; Nucci, M. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2000**, *95*, 153.
- Menzin, J.; Meyers, J. L.; Friedman, M.; Perfect, J. R.; Langston, A. A.; Danna, R. P.; Papadopoulos, G. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **2009**, *66*, 1711.
- Kontoyiannis, D. P.; Mantadakis, E.; Samonis, G. *J. Hosp. Infect.* **2003**, *53*, 243.
- Cornelia, L.-F. *Mycoses* **2009**, *52*, 197.
- Georgopapadakou, N. H.; Walsh, T. J. *Science* **1994**, *264*, 371.
- Naeger-Murphy, N.; Pile, J. C. *J. Hosp. Med.* **2009**, 102.
- Mathew Bijoy, P.; Nath, M. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 310.
- Vanden Bossche, H. *Rev. Iberoam. Micol.* **1997**, *14*, 44.
- Doležal, R.; Waisser, K.; Petrlíková, E.; Kuneš, J.; Kubíková, L.; Macháček, M.; Kaustová, J.; Dahse, H. M. *Arch. Pharm. Life Sci.* **2009**, *342*, 113.
- Ryder, N. S.; Frank, I.; Dupont, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *5*, 858.
- Wagner, G.; Singer, D. *Z. Chem.* **1963**, *3*, 148.
- Wagner, G.; Singer, D.; Weuffen, W. *Pharmazie* **1966**, *21*, 613.
- Weuffen, W.; Wagner, G.; Singer, D.; Petermann, M. *Pharmazie* **1966**, *21*, 613.
- Hansch, C.; Leo, A. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*; John Wiley & Sons: New York, 1979.

Supplementary Material for the Manuscript

“*N*-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with a Promising Antimycotic Activity”

AUTHORS: Eva Petrlíková^{a,*}, Karel Waisser^a, Vladimír Buchta^{b,c}, Petr Jílek^c, Marcela Vejsová^c

Manuscript type: Article

Supplementary data

***In-vitro* antifungal susceptibility testing**

The broth microdilution test M27-A¹ was used for the assessment of *in-vitro* antifungal activity of the synthesized compounds against *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon asahii* 1188 (TA), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), and *Absidia corymbifera* 272 (AC). Fluconazole (Flu) was used as the reference drug. The procedure was performed with twofold dilution of the compounds in RPMI 1640 medium (Sevapharma, Prague, Czech Republic) buffered to pH 7.0 with 0.165 M of 3-morpholino-propane-1-sulfonic acid. Drug-free controls were included. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were defined as 80% (IC₈₀) and a higher reduction of growth in comparison with control. The values of MICs were determined after 24 h and 48 h of static incubation at 35 °C. For *T. mentagrophytes*, the final MICs were determined after 72 h and 120 h of incubation.

Lipophilicity testing

TLC was performed on silica gel plates impregnated with trioctadecyl silane, precoated with the fluorescent indicator Silufol UV 254 (RP-18 F254s of Merck Company).

The mobile phase was represented by phosphate buffer at pH 7.4 with acetone. The concentrations of acetone in the mobile phase were 80, 75, 70, 65 and 60%. All the samples were put on in 5-10% solutions in acetone (2-4 μ l) and the average R_F values were obtained from three measurements for each sample. The R_M values were calculated by means of the formula: $R_M = \log (1/R_F - 1)$ and the extrapolations to zero acetone were done (Table 6). Biagi et al.² used a similar method to study the lipophilicity of phenols.

Table 6

The correlation between the calculated $\log P$ and R_M values for each acetone concentration were set up using the Linreg program for Microsoft Excel in order to verify the predicative value of the calculated $\log P$. Both parameters of lipophilicity correlated with each other (Eq. 17-23 in Table 7).

Table 7

Also the Hansch approach was carried out to study the relationship between the structure of *N*-benzylsalicylthioamides and their antifungal activity with the use of R_M values for 50% acetone instead of the calculated $\log P$ (Eq. 24-39 in Tables 8 and 9).

Table 8

Table 9

In this case as well, biological activity increases with increasing lipophilicity, with the presence of halogens as the substituents and mostly with the increasing values of the constants σ .

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved Standard M27-A., NCCLS, Villanova, PA, 1997.
2. Biagi, G. L., Gandolfi, O., Guerra, M. C., Barbaro, A. M., Cantelli-Forti, G., *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 868.

Table 6. R_M values

Table 7. Correlations between lipophilicity expressed by experimentally obtained R_M and calculated $\log P$

Table 8. Results of QSAR calculations (R_M for 50% acetone)

Table 9. Results of QSAR calculations (R_M for 50% acetone)

Table 6. R_M values

Compound	acetone (%)							
	80	75	70	65	60	55	50	0
1	-0.22	-0.05	0.12	0.37	0.57	0.83	1.12	3.29
2	-0.19	0.01	0.21	0.48	0.71	0.95	1.28	3.64
3	-0.27	-0.07	0.10	0.35	0.57	0.83	1.08	3.30
4	-0.20	0.00	0.19	0.46	0.67	0.93	1.25	3.58
5	-0.16	0.03	0.25	0.51	0.75	1.03	1.31	3.74
6	-0.13	0.06	0.27	0.56	0.80	1.12	1.34	3.87
7	-0.18	0.03	0.21	0.52	0.74	1.00	1.28	3.69
8	-0.15	0.05	0.25	0.51	0.75	1.09	1.25	3.68
9	-0.26	-0.07	0.18	0.35	0.61	0.81	1.04	3.21
10	-0.26	-0.10	0.05	0.29	0.48	0.69	0.99	2.97
11	-0.32	-0.14	0.02	0.23	0.39	0.59	0.94	2.84
12	-0.26	-0.08	0.09	0.29	0.49	0.72	0.97	2.96
13	-0.26	-0.08	0.09	0.29	0.49	0.70	0.92	2.87
14	-0.20	-0.02	0.14	0.37	0.59	0.83	1.04	3.12
15	-0.33	-0.15	0.00	0.22	0.37	0.62	0.80	2.67
16	-0.50	-0.31	-0.19	-0.13	0.05	0.34	0.56	2.16
17	-0.17	0.07	0.25	0.52	0.74	0.95	1.19	3.46
18	-0.32	-0.12	0.12	0.27	0.53	0.70	0.94	3.01
19	-0.28	-0.10	0.16	0.31	0.58	0.74	0.94	3.01
20	-0.24	0.03	0.19	0.39	0.67	0.87	1.08	3.26
21	-0.13	0.04	0.31	0.50	0.87	1.16	1.34	3.93

Table 7. Correlations between lipophilicity expressed by experimentally obtained R_M and calculated $\log P$

Eq.	% acetone	Calculation
17	50	$R_M = 0.264 (\pm 0.015) \log P - 0.088 (\pm 0.066)$ $R = 0.97 \quad s = 0.049 \quad n = 21$
18	55	$R_M = 0.262 (\pm 0.015) \log P - 0.325 (\pm 0.069)$ $R = 0.97 \quad s = 0.051 \quad n = 21$
19	60	$R_M = 0.230 (\pm 0.020) \log P - 0.425 (\pm 0.090)$ $R = 0.94 \quad s = 0.066 \quad n = 21$
20	65	$R_M = 0.194 (\pm 0.019) \log P - 0.492 (\pm 0.085)$ $R = 0.92 \quad s = 0.063 \quad n = 21$
21	70	$R_M = 0.142 (\pm 0.014) \log P - 0.483 (\pm 0.064)$ $R = 0.92 \quad s = 0.047 \quad n = 21$
22	75	$R_M = 0.114 (\pm 0.012) \log P - 0.549 (\pm 0.053)$ $R = 0.91 \quad s = 0.039 \quad n = 21$
23	80	$R_M = 0.108 (\pm 0.010) \log P - 0.715 (\pm 0.043)$ $R = 0.93 \quad s = 0.032 \quad n = 21$

Table 8. Results of QSAR calculations (R_M for 50% acetone)

Eq.	Strain; incubation time	QSAR calculations (R_M for 50% acetone)
24	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 24h	log MIC = -1.694 (± 0.380) R_M -0.055 (± 0.162) I -0.010 (± 0.224) σ + 3.538 (± 0.349) R = 0.85 s = 0.245 F = 12.21 n = 18
25	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859; 48h	log MIC = -1.523 (± 0.506) R_M -0.090 (± 0.141) I -0.211 (± 0.336) σ + 3.690 (± 0.514) R = 0.86 s = 0.210 F = 12.34 n = 17
26	<i>Candida tropicalis</i> 156; 24h	log MIC = -1.120 (± 0.402) R_M -0.069 (± 0.112) I -0.479 (± 0.267) σ + 3.156 (± 0.408) R = 0.90 s = 0.167 F = 17.98 n = 17
27	<i>Candida tropicalis</i> 156; 48h	log MIC = -1.082 (± 0.653) R_M -0.123 (± 0.181) I -0.459 (± 0.434) σ + 3.364 (± 0.664) R = 0.79 s = 0.271 F = 7.12 n = 17
28	<i>Candida krusei</i> E28; 24h	log MIC = -2.112 (± 0.513) R_M -0.157 (± 0.133) I -0.919 (± 0.359) σ + 3.859 (± 0.524) R = 0.96 s = 0.193 F = 49.64 n = 16
29	<i>Candida krusei</i> E28; 48 h	log MIC = -1.479 (± 0.497) R_M -0.226 (± 0.129) I -0.728 (± 0.347) σ + 3.526 (± 0.508) R = 0.95 s = 0.187 F = 33.74 n = 16
30	<i>Candida glabrata</i> 20/I; 24h	log MIC = -0.888 (± 0.675) R_M -0.078 (± 0.175) I -1.030 (± 0.471) σ + 2.931 (± 0.689) R = 0.88 s = 0.253 F = 13.43 n = 16
31	<i>Candida glabrata</i> 20/I; 48h	log MIC = -1.336 (± 0.776) R_M -0.092 (± 0.201) I -0.537 (± 0.543) σ + 3.655 (± 0.793) R = 0.82 s = 0.291 F = 8.11 n = 16

Table 9. Results of QSAR calculations (R_M for 50% acetone)

Eq.	Strain; incubation time	QSAR calculations (R_M for 50% acetone)
32	<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 24h	log MIC = -1.492 (± 0.539) R_M -0.477 (± 0.226) I -0.202 (± 0.354) σ + 3.363 (± 0.525) R = 0.80 s = 0.394 F = 9.13 n = 19
33	<i>Trichosporon asahii</i> 1188; 48h	log MIC = -1.301 (± 0.433) R_M -0.477 (± 0.182) I -0.164 (± 0.284) σ + 3.313 (± 0.421) R = 0.84 s = 0.316 F = 12.05 n = 19
34	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 24h	log MIC = -1.495 (± 0.424) R_M -0.499 (± 0.118) I -0.305 (± 0.278) σ + 3.582 (± 0.412) R = 0.87 s = 0.310 F = 16.08 n = 19
35	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231; 48h	log MIC = -1.566 (± 0.446) R_M -0.440 (± 0.190) I -0.623 (± 0.259) σ + 3.786 (± 0.409) R = 0.90 s = 0.288 F = 20.82 n = 18
36	<i>Absidia corymbifera</i> 272; 24h	log MIC = -2.181 (± 0.498) R_M -0.212 (± 0.209) I + 0.410 (± 0.327) σ + 3.524 (± 0.484) R = 0.83 s = 0.363 F = 10.94 n = 19
37	<i>Absidia corymbifera</i> 272; 48 h	log MIC = -1.824 (± 0.489) R_M -0.429 (± 0.205) I + 0.057 (± 0.321) σ + 3.496 (± 0.475) R = 0.84 s = 0.357 F = 12.11 n = 19
38	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445; 72h	log MIC = -1.440 (± 0.501) R_M -0.410 (± 0.210) I -0.430 (± 0.329) σ + 2.801 (± 0.487) R = 0.82 s = 0.366 F = 10.13 n = 19
39	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445; 120h	log MIC = -1.732 (± 0.520) R_M -0.120 (± 0.218) I -0.492 (± 0.342) σ + 3.032 (± 0.506) R = 0.78 s = 0.380 F = 7.69 n = 19

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., JÍLEK, P., DUFKOVÁ, I.:
Antibacterial Activity of *N*-Benzylsalicylthioamides, *Folia
Microbiol.* 2010, in press.

Antibacterial Activity of *N*-Benzylsalicylthioamides

Eva Petrlíková^a, Karel Waisser^a*, Petr Jílek^b, Ida Dufková^b

^aDepartment of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic, E-mail: Eva.Petrlikova@faf.cuni.cz, Fax: +42 0495 067166

^bDepartment of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic

The *in-vitro* biological activity of *N*-benzylsalicylthioamides against eight bacterial strains was determined by broth microdilution method and results were compared with those obtained with neomycin, penicillin G, ciprofloxacin and phenoxymethyl penicillin. The compounds showed moderate to high activity against Gram-positive bacteria; especially compounds **4**, **6**, **13**, **16-21** and **24** exhibited comparable or higher activity than reference drugs. The antibacterial activity was analyzed by quantitative structure-activity relationship (QSAR). The antibacterial activity increased with lipophilicity, with presence of halogens and with increasing value of Hammett substituent constants σ .

Abbreviations

24/48 h	24/48 hours incubation	s	standard deviation
Cipr	Ciprofloxacin HCC	WHO	World Health Organisation
DMSO	Dimethylsulfoxide	σ	Hammett constant
F	Fischer-Snedecor F-test		
I	Indicator parameter		
log <i>P</i>	partition coefficient (octanol-water)		
MIC	minimum inhibitory concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)		
n	number of compounds used for the calculation		
Neom	Neomycini sulfas		
Pen	Penicillin G		
Phen	Phenoxymethyl penicillin		
QSAR	quantitative structure-activity relationship		
R	correlation coefficient		

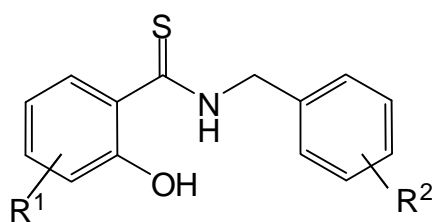
Antibiotics belong to the most important achievements in drug development in the 20th century. They helped to save many lives and to bring many serious infectious diseases under control. Presently, there is an increasing number of pathogenic organisms resistant to antibiotics and also the World Health Organization (WHO, 2000) proclaimed the resistance to antibiotics as a serious global problem.

N-benzylsalicylthioamides belong to our most perspective compounds. Their previous study (Doležal *et al.* 2009) was oriented on the antimycobacterial properties. Having found out that they are more active than the commonly used anti-tuberculosis drugs, we tried to investigate their activities against some bacteria to find out whether they can serve as broad spectrum antibiotics. The goal of this paper was to study the antibacterial activity of *N*-benzylsalicylthioamides and to find some correlations between the biological activity and their structure.

Materials and methods

Chemistry

N-benzylsalicylthioamides were prepared by the microwave-assisted thionation of starting *N*-benzylsalicylamides. The synthesis as well as the analytical data and the evaluation of the antimycobacterial activity are in full details described in our previous paper (Doležal *et al.* 2009). Overview of the compounds under study and their calculated log *P* that was used for QSAR study are summarized in Scheme 1.



Comp.	R ¹	R ²	log <i>P</i>	Comp.	R ¹	R ²	log <i>P</i>
1	H	3-CH ₃	3.99	13	4-Cl	4-Br	4.89
2	H	3-Cl	4.06	14	4-OCH ₃	H	3.38
3	H	4-CH ₃	3.99	15	4-OCH ₃	3-Cl	3.94
4	H	4- <i>tert</i> -butyl	5.21	16	5-Cl	H	4.06
5	H	4-F	3.66	17	5-Cl	4-F	4.22
6	H	3,4-Cl ₂	4.62	18	5-Cl	3,4-Cl ₂	5.18
7	3-CH ₃	4-Cl	4.55	19	5-Br	3-Br	5.16
8	4-CH ₃	H	3.99	20	5-Br	4-Br	5.16
9	4-CH ₃	3-NO ₂	2.73	21	5-Br	3,4-Cl ₂	5.45
10	4-CH ₃	4-CH ₃	4.48	22	5-NO ₂	4-CH ₃	2.73
11	4-CH ₃	4- <i>tert</i> -butyl	5.70	23	5-OCH ₃	3-NO ₂	2.45
12	4-CH ₃	4-Cl	4.55	24	3,5-Cl ₂	4- <i>tert</i> -butyl	6.33

Scheme 1. Overview of compounds and log *P*.

Biology

The organisms examined included the following strains from the Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 4516, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. These strains are recommended as standards for testing of antibacterial activities. Other strains were clinical isolates (Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* H 5996/08 – methicilin resistant, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 – ESBL positive. The minimum inhibitory concentration was determined after 24 and 48 hours of static incubation and the values of MICs of commonly used antibiotics neomycin, penicillin G, ciprofloxacin and phenoxymethyl penicillin were included for comparison.

Tests for biological activity

The antibacterial activity of all compounds was evaluated by the microdilution broth method (Jones, Barry 1987). All strains were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C and maintained on the same medium at 4 °C. Prior to testing, each strain was passaged onto MHA. Bacterial inocula were prepared by suspending in sterile 0.85% saline. The cell concentration of the inoculum was adjusted using densitometer to yield suspension of density equivalent 0.5 McFarland scale which is equal to a number of 1.5×10^8 viable colony forming units (CFU)/mL.

The compounds were dissolved in DMSO, and the antibacterial activity was determined in Mueller-Hinton liquid broth (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. Controls consisted of medium and DMSO alone. The final concentration of compounds was 0.98, 1.95, 3.90, 7.81, 15.62, 31.25, 62.25, 125, 250 and 500 $\mu\text{mol/L}$. The final concentration of DMSO in the test medium did not exceed 1% (v/v) of the total solution composition. The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as 95% inhibition of bacterial growth as compared to control, was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C.

Calculations

All regression calculations (Eq. 1-8 in Table 3) were set up using the Multireg program for Microsoft Excel. The logarithms of the partition coefficient ($\log P$) were calculated using ChemBioDraw Ultra 11.0 and the values are presented in Scheme 1. The structures are in Scheme 1, the biological activity data in Tables 1 and 2 and the values of σ Hammet constants were overtaken from the literature (Hansch, Leo 1979).

Results and discussion

The previous research of antimycobacterial properties of *N*-benzylsalicylthiomides encouraged their present study with the hypothesis that they can serve as broad spectrum antibiotics. The examined bacterial strains included both Gram-positive and Gram-negative bacteria and all the compounds with the exception of **11** show comparable or better activities against Gram-positives than standards (neomycin, penicillin G, ciprofloxacin and phenoxymethyl penicillin) (Tables 1 and 2). Especially compounds **4**, **6**, **13**, **16-21** and **24** exhibited high activity within the range 0.98-31.25 $\mu\text{mol/l}$ (Table 1). 5-Bromo-*N*-(4-bromobenzyl)salicylthioamide with the activity in the range 0.98-3.9 $\mu\text{mol/L}$ against Gram-positives is the most perspective compound. The activity of this derivative is comparable or

better than all reference drugs in the case of *S. aureus* methicilin resistant, *S. epidermidis* and *Enterococcus*.

All the compounds have small if any inhibition influence on Gram-negative bacteria. This partial efficiency against Gram-positives seems to be positive: Selective toxicity signal the structure specific effect (in contrast to common toxicity). The narrower spectrum of activity is desirable in majority of antibacterial agents used in therapy – such drugs affect the indigenous, non-pathogenic bacteria less adversely as do the broad-spectral agents. Structure of *N*-benzylsalicylthioamides is merely absent among antimicrobial agents used as antibiotics or disinfectant, hence the mechanisms of resistance are not selected until now.

Table 1. Biological activity of the most active compounds and reference drugs.

Strains	Compounds (MIC ($\mu\text{mol/l}$) 24/48 h)													
	4	6	13	16	17	18	19	20	21	24	Neom	Pen	Cipr	Phen
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	1.95/ 1.95	0.98/ 0.98	0.98/ 1.95	3.9/ 3.9	1.95/ 3.9	0.98/ 1.95	0.98/ 3.9	0.98/ 0.98	0.98/ 1.95	0.98/ 1.95	3.9/ 3.9	0.24/ 0.24	0.98/ 0.98	0.24/ 0.24
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin resistant	3.9/ 3.9	1.95/ 1.95	0.98/ 1.95	3.9/ 3.9	1.95/ 3.9	0.98/ 1.95	0.98/ 3.9	0.98 / 0.98	0.98/ 1.95	0.98/ 1.95	0.98/ 0.98	125/ 125	500/ 500	250/ 500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	3.9/ 3.9	1.95/ 1.95	0.98 / 1.95	3.9/ 3.9	1.95/ 3.9	0.98/ 3.9	0.98/ 3.9	0.98 / 0.98	0.98 / 1.95	0.98 / 1.95	3.9/ 7.81	31.25/ 125	250/ 250	62.5/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	7.81/ 31.25	7.81/ 31.25	0.98 / 3.9	7.81/ 31.25	1.95/ 7.81	3.9/ 7.81	3.9/ 31.25	0.98 / 3.9	31.25/ 31.25	1.95/ 3.9	250/ 250	7.81/ 15.62	0.98/ 0.98	7.81/ 7.81
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>500/ >500	250/ 500	31.25/ 31.25	125/ 125	62.5/ 62.5	15.62/ 31.25	7.81/ 31.25	31.25/ 31.25	125/ 125	>500/ >500	0.98/ 0.98	125/ 125	0.06/ 0.06	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>500/ >500	250/ 500	62.5/ 62.5	250/ 250	31.25/ 31.25	62.5/ 62.5	7.8/ 62.5	31.25/ 31.25	125/ 250	>500/ >500	0.98/ 0.98	250/ 500	0.12/ 0.12	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL positive	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	500/ 500	500/ 500	62.5/ 62.5	31.25/ 250	62.5/ 62.5	125/ 125	>500/ >500	0.98/ 0.98	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	>500/ >500	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	62.5/ 62.5	15.62/ 15.62	1.95 / 3.9	7.81/ 15.62	3.9 / 3.9	15.62/ 15.62	31.25/ 31.25	7.81/ 15.69	>500/ >500	3.9/ 7.81	>500/ >500

Table 2. Biological activity of less active compounds.

Strains	Compounds (MIC ($\mu\text{mol/l}$) 24/48 h)													
	1	2	3	5	7	8	9	10	11	12	14	15	22	23
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	7.8/ 15.62	15.62/ 15.62	15.62/ 15.62	15.62/ 15.62	15.62/ 15.62	62.5/ 62.5	62.5/ 62.5	15.62/ 31.25	>500/ >500	7.81/ 7.81	62.5/ 62.5	15.62/ 15.62	7.81/ 7.81	62.5/ 125
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08, methicilin res.	15.62/ 31.25	15.62/ 15.62	15.62/ 15.62	15.62/ 31.25	15.62/ 15.62	31.25/ 62.5	62.5/ 62.5	15.62/ 31.25	>500/ >500	7.81/ 7.81	62.5/ 125	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	62.5/ 125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	7.8/ 31.25	15.62/ 15.62	15.62/ 62.5	15.62/ 15.62	15.62/ 31.25	62.5/ 62.5	62.5/ 62.5	31.25/ 31.25	>500/ >500	15.62/ 15.62	125/ 250	31.25/ 31.25	7.81/ 7.81	125/ 250
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	62.5/ 125	62.5/ 62.5	250/ 250	125/ 125	31.25/ 125	62.5/ 125	250/ 500	31.25/ 62.5	>500/ >500	>500/ >500	250/ 500	62.5/ 125	15.62/ 62.5	250/ 250
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	>500/ >500	>500/ >500	500/ 500	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08	>500/ >500	>500/ >500	250/ 250	250/ 250	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08, ESBL positive	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961	500/ 500	500/ 500	62.5/ 62.5	125/ 125	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	>500/ >500	500/ >500	500/ 500	>500/ >500

The Hansch approach was carried out to study the relationship between the structure of *N*-benzylsalicylthioamides and their biological activity against Gram-positive bacteria. The QSAR study included the results obtained both after 24 and 48 hours incubation. The parameters with the greatest influence on the biological activity include lipophilicity ($\log P$), Indicator parameter I for halogens as R^2 substituents, and Hammett substituent constants σ , expressed with regard to the carbonyl group of the acyl-moiety.

The equations 1-8 (Table 3) show that the biological activity increases with increasing lipophilicity, with the presence of halogens and with an increasing value of constants σ . The influence of halogens on the activity could be explained by their electron-withdrawing effect.

Table 3. QSAR calculations.

$$\log \text{MIC} = a \cdot I + b \cdot \log P + c \cdot \sigma + e$$

Eq.	Strain; incubation time	a	b	c	e	R	s	F	n
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	-0.300	-0.399	-1.106	2.788	0.92	0.282	35.80	23
	CCM 4516; 24h	(±0.127)	(±0.073)	(±0.226)	(±0.295)				
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	-0.301	-0.353	-0.895	2.695	0.88	0.324	20.72	23
	CCM 4516; 48h	(±0.146)	(±0.084)	(±0.259)	(±0.338)				
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	-0.288	-0.378	-1.207	2.740	0.96	0.209	65.73	23
	H 5996/08,methicilin res.; 24h	(±0.094)	(±0.054)	(±0.167)	(±0.218)				
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	-0.395	-0.336	-1.174	2.825	0.90	0.323	26.52	23
	H5996/08,methicilin res.; 48h	(±0.145)	(±0.084)	(±0.258)	(±0.337)				
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-0.328	-0.388	-1.385	2.877	0.94	0.264	48.84	23
	H 6966/08; 24h	(±0.119)	(±0.068)	(±0.211)	(±0.276)				
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-0.359	-0.344	-1.229	2.881	0.89	0.337	24.88	23
	H 6966/08; 48 h	(±0.152)	(±0.088)	(±0.270)	(±0.352)				
7	<i>Enterococcus sp.</i>	-0.264	-0.393	-1.345	3.303	0.84	0.470	14.45	22
	J 14365/08; 24h	(±0.215)	(±0.122)	(±0.388)	(±0.491)				
8	<i>Enterococcus sp.</i>	-0.228	-0.350	-1.112	3.442	0.89	0.326	22.26	22
	J 14365/08; 48h	(±0.149)	(±0.085)	(±0.269)	(±0.341)				

In conclusion, *N*-benzylsalicylthioamides form a new group of potential antibiotics with the main effect on Gram-positive bacteria and the possibility how to obtain the efficient antimicrobial compounds is to ensure their optimal lipophilicity and to substitute the benzyl moiety with halogens.

This study is a part of the research project number MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

References

- Doležal R., Waisser K., Petrlíková E., Kuneš J., Kubicová L., Macháček M., Kaustová J., Dahse H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics. *Arch. Pharm. Life Sci.* **342**, 113-119 (2009).
- Hansch, C.; Leo, A. *Substituent Constants For Correlation Analysis in Chemistry and Biology*; John Willey & Sons: New York, 1979.
- Jones RN, Barry AL: Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 1920 – 1925 (1987).
- WHO: Essential Drugs Monitor (2000);
<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2248e/s2248e.pdf> (accessed Jan 27, 2010).

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., HEINISCH, L.,
STOLAŘÍKOVÁ, J.: New *S*-Benzylisothiosemicarbazones with
Antimycobacterial Activity. *Folia Microbiol.*, under review.

New *S*-Benzylisothiosemicarbazones with Antimycobacterial Activity

Eva Petrlíková^{a*}, Karel Waisser^a, Lothar Heinisch^b, Jiřina Stolařiková^c

^a*Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic*

^b*Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knoell Institute, 07745, Jena, Germany*

^c*Regional Institute of Public Health, Partyzánské náměstí 7, Ostrava, Czech Republic*

Salicylaldehyde- and benzaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones were tested for *in-vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* and two strains of *M. kansasii*. Compounds show a moderate to a high biological activity; in particular compounds **1e** and **2c** were found to have promising antimycobacterial properties.

Abbreviations

14/21d	14/21 days of incubation
DMSO	dimethylsulfoxide
MIC	minimum inhibitory concentration ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)
WHO	World Health Organisation

The recent reappearance of tuberculosis represents a serious problem worldwide. The situation in the control of tuberculosis is fuelled by a rise in multidrug-resistant TB (MDR-TB) (Zignol et al., 2006). Also the World Health Organization (WHO, 2010) proclaimed the resistance to antitubercotics as a serious global problem. One of the major problems in the treatment of tuberculosis is also the co-infection with HIV/AIDS (Aaron et al., 2004). This is also why it is necessary to develop new, high active antituberculosis drugs that can be used together with the drugs used for HIV treatment.

The aim of this paper is to investigate the antimycobacterial activity of salicylaldehyde- and benzaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones. The synthesis was developed by Heinisch (1977). The experimental evidence has demonstrated that isothiosemicarbazones possess a good antiviral and antimycobacterial activity (Waisser, Heinsich 2005, Waisser, Petrlíková 2007). This paper continues in the Heinisch research by preparing new derivatives and by investigating their biological activity. The alkylsulfanyl group is believed to be the pharmacophore responsible for the antimycobacterial activity (Klimešová et al., 2002, Waisser et al., 1998).

Materials and methods

Chemistry

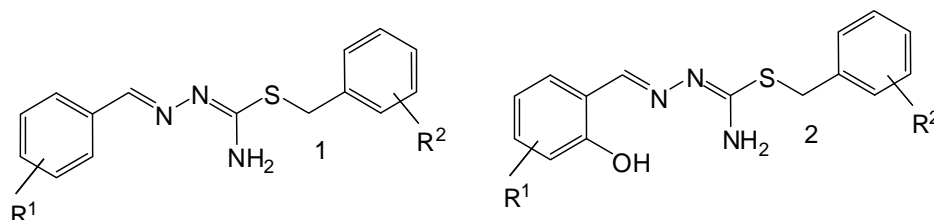
Salicylaldehyde- and benzaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones were prepared from the starting *S*-benzylisothiosemicarbazides. The details of the synthesis and the analytical data are to be soon published in a journal dealing with organic synthesis research.

Microbiology

The *in-vitro* antimycobacterial activity of *S*-benzylisothiosemicarbazones was investigated against *M. tuberculosis* CNCTC My 331/ 88 (identical with H37RV and ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/ 80 (identical with ATCC 12 478, resistant to INH), *M. avium* CNCTC My 330/ 88 (identical with ATCC 25291, resistant to INH) and *M. kansasii* 6509/96. All the strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague. The only exception is *M. kansasii* 6509/ 96 that was clinically isolated and that is in contrast to the standard strain not resistant to isoniazid (INH). The dilution-micromethod was used for the determination of minimum

inhibitory concentrations (MIC) and the MIC values for the standard INH were included for sake of comparison. The overview of the biological activity together with the activity of INH is presented in Table 1.

Table 1. The overview and the minimum inhibitory activity of *S*-benzylisothiosemicarbazones.



Compound		MIC ($\mu\text{mol/l}$); Incubation time 14 d/21d				
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/ 88	<i>M. avium</i> My 330/ 88	<i>M. kansasii</i> My 235/ 80	<i>M. kansasii</i> 6 509/ 96	
1a	H	H	62.5/125	32/62.5	62.5/62.5	125/125
1b	H	3-Cl	32/62.5	16/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
1c	H	4-CH ₃	32/62.5	16/32	62.5/62.5	62.5/62.5
1d	H	4-CF ₃	32/62.5	16/62.5	62.5/62.5	32/62.5
1e	H	4-Br	16/32	16/16	62.5/62.5	32/62.5
2a	H	3-Cl	32/32	62.5/125	62.5/62.5	16/32
2b	H	4-F	32/n	n/n	n/n	n/n
2c	H	4-Cl	8/16	n/n	32/62.5	32/n
2d	H	4-Br	16/32	n/n	32/32	32/32
2e	5-Cl	3-Cl	32/32	n/n	32/32	32/n
2f	5-Cl	3-OCH ₃	32/32	n/n	32/32	62.5/62.5
2g	5-Cl	4-CH ₃	32/32	n/n	62.5/n	n/n
2h	5-Cl	4-F	16/16	32/n	16/32	32/32
2i	5-Cl	4-Cl	16/16	n/n	32/32	32/32
2j	5-Br	3-Cl	32/32	n/n	32/n	n/n
2k	5-Br	4-CF ₃	32/32	32/n	62.5/62.5	32/32
2l	5-Br	4-F	16/16	62.5/n	32/32	32/32
2m	5-Br	4-Br	16/32	n/n	n/n	32/n
2n	3,5-Cl ₂	4-Br	16/32	n/n	32/32	n/n
INH			1/1	>250/>250	>250/>250	8/8

n: the MIC value could not be determined due to the limited solubility of the compound in the test medium

Antimycobacterial susceptibility testing

The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague). Each strain was simultaneously inoculated into a Petri dish containing the Löwenstein-Jensen medium for the control of sterility of the inoculum and its growth. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2 and 1 $\mu\text{mol/L}$. The MICs were determined after incubation at 37 °C for 14 days and 21 days. The MIC was the lowest concentration of the antimycobacterially effective substance (on the above concentration scale) at which the inhibition of the growth of mycobacteria occurred. The evaluation was repeated three times.

Results and discussion

The majority of the MIC values of *S*-benzylisothiosemicarbazones under study is generally within the range of 16-62.5 $\mu\text{mol/l}$. Salicylaldehyde-*S*-4-chloro-benzylisothiosemicarbazone (**2c**) possesses the best activity against *M. tuberculosis* and is active against other mycobacterial strains as well. A substitution in the benzyl moiety with a halogen seems to increase the biological activity. Especially the activity against *M. avium* is very important, since the bacteria of the *M. avium* strain usually attack the patients with deficient immunity and the disease is fatal in many cases (Shafran et al. 1996). Benzaldehyde-*S*-4-bromo-benzylisothiosemicarbazone (**1e**) shows the highest activity against *M. avium* and is selected together with the compound **2c** for future investigation.

In conclusion, salicylaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones and benzaldehyde-*S*-benzylisothiosemicarbazones form a new group of antimycobacterial compounds with an alkylsulfanyl functional group as the pharmacophore.

This work is financially supported by project No. MSM 0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic and Grant Agency of Charles University (GAUK 11809/2009/B-CH/FAF).

References

- Aaron, A., Saadoun, D., Calatroni, I., Launay, O., Mémain, N., Vincent, V., Marchal, G., Dupont, B., Bouchaud, O., Valeyre, D., Lortholary, O.: Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect.* **10**, 388-398 (2004).
- Heinisch, L., Tonew, M., Tonew, E.: Synthese und antivirale Wirkung N-heterocyclischer Formylisothiosemicarbazone. *Pharmazie* **32**, 752-755 (1977).
- Klimešová, V., Kočí, J., Zahajský, I.: Advances in the development of new antimycobacterial agents. The alkylsulfanyl group-the pharmacophore of antimycobacterial activity. *Česk Slov Farm.* **51**, 26-36 (2002).
- Shafran, S. D., Singer, J., Zarowny, D. P., Phillips, P., Salit, I., Walmsley, S. L., Fong, I. W., Gill, M. J., Rachlis, A. R., Lalonde, R. G., Fanning, M. M., Tsoukas, C. M.: A comparison of two regimens for the treatment of Mycobacterium avium complex bacteremia in AIDS: rifabutin, ethambutol, and clarithromycin versus rifampin, ethambutol, clofazimine, and ciprofloxacin. *N Engl J Med.* **335**, 377-383 (1996).
- Waisser, K., Hladůvková, J., Hrabálek, A., Klimešová, V., Kubicová, L., Kuneš, J., Palát, K., Macháček, M., Vinšová, J., Buchta, V., Jílek, P., Odlerová Ž.: New pharmacophores of antimycobacterial and antimycotical activity. *Folia Pharm Univ Carol.* **21-22**, 69-81 (1998).
- Waisser, K., Heinisch, L., Šlosárek, M., Janota, J.: New Antimycobacterial S-Alkylisothiosemicarbazones, *Folia Microbiol.* **50**, 479-481 (2005).
- Waisser, K., Petrlíková, E., Heinisch, L., Šlosárek, M., Janota, J.: New antimycobacterial S-alkyl-isothiosemicarbazones. *Folia Pharm Univ Carol.* **35-36**, 37-39 (2007).
- WHO: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response, 2010. Available online:
<http://www.who.int/tb/publications/2010/978924599191/en/index.html>
- Zignol, M., Hosseini, M. S., Wright, A., Weezenbeek van-L. C., Nunn, P., Watt, C. J., Williams, B. G., Dye, G.: Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis.*, 194, 479-485 (2006).

PETRLÍKOVÁ, E., WAISSER, K., BUEHRDEL, G.,
BECKERT, R., KAUSTOVÁ, J.: Search for New
Antituberculotics. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 2009, vol. 38,
p. 15–18.

SEARCH FOR NEW ANTITUBERCULOTICS

EVA PETRLÍKOVÁ¹, KAREL WAISSER¹, GUNTHER BÜHRDEL²,
RAINER BECKERT², JARMILA KAUSTOVÁ³

¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Charles University in Prague, Czech Republic
e-mail: waisser@faf.cuni.cz

² Institute of Organic and Macromolecular Chemistry, Friedrich Schiller University,
Humboldt Str. 10, 07743 Jena, Germany

³ Department for Diagnostics of Mycobacteria, Regional Institute of Public Health in Ostrava, Czech Republic

Dedicated to Assoc. Prof. Milan Čeladník to his 85th anniversary

ABSTRACT

1,2-bis-fluoren-9-ylidene-*N,N*-(4-methoxyphenyl)-ethan-1,2-diamine (**1**) and 1,2-bis-fluoren-9-ylidene-*N,N'*-diphenyl-ethan-1,2-diamine (**2**) form the new group of potential antituberculotics. The distance between nitrogen atoms is similar as in amidines which makes it interesting from the scientific point of view. The working group of Beckert has long tradition with amidine as pharmacophore of antimycobacterial activity in heterocycles. It seems that pharmacophore also can be the 1,2-diaminoethyl group when orientation of according X-ray has the torsion angle 45°.

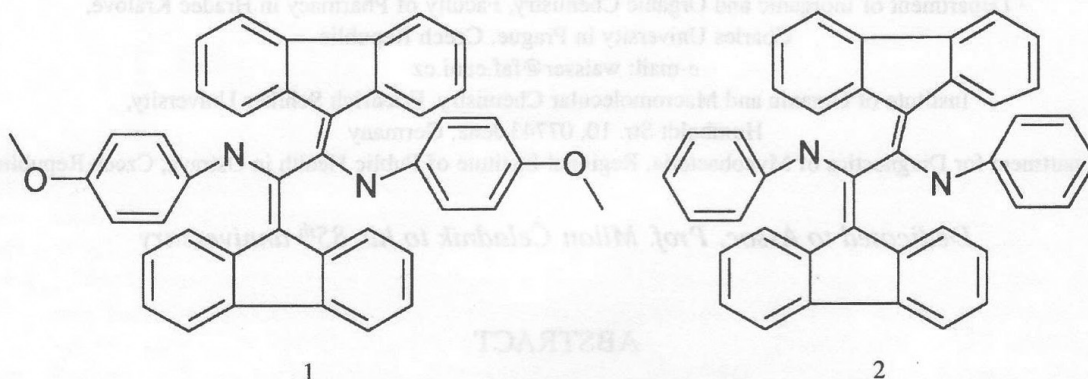
Keywords: tuberculostatics – fluoren – antituberculotics – trans-1,2-diaminoethan

INTRODUCTION

The prognosis that after the year 2000 the tuberculosis will not occur in the developed part of the world was wrong. The tuberculosis has always been a serious problem of third world countries. By migration of populations, multidrug resistant strains of *M. tuberculosis* have been getting to Europe and North America. In 2005, mortality and morbidity statistics included 14.6 million chronic active tuberculosis cases, 8.9 million new cases, and 1.6 million deaths, mostly in developing countries. Central Europe is endangered by the multidrug resistant strains coming mainly from the countries of the former Soviet Union. The search for antituberculotics of the new structure belongs to the topic of medicinal chemistry. We cooperate on research in this way with several German institutes. The synthesis of compounds under study was realized in laboratory of Institute of Organic and Macromolecular Chemistry of Friedrich Schiller University in Jena during work of one of the authors in Jena. Goal of the paper is an introduction of the structure of new group of potential antituberculotics. The synthesis and structure elucidation will be published in chemical papers.²

Chemistry

The synthesis and structural evidence will be printed in journals of organic chemistry. We prepared two compounds in connection with this paper, namely 1,2-bis-fluoren-9-ylidene-*N,N'*-(4-methoxyphenyl)-ethan-1,2-diamine (**1**) and 1,2-bis-fluoren-9-ylidene-*N,N'*-diphenyl-ethan-1,2-diamine (**2**).



Microbiology

For the in vitro evaluation of the antimycobacterial activity of the substances was used the strain of *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 (identical with H37RV and ATCC 27294), obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague. The antimycobacterial activity of the compounds was determined in the Šula semisynthetic medium (SEVAC, Prague). This medium (with bovine serum) is routinely used in the Czech Republic. Each strain was simultaneously inoculated into a Petri dish containing the Löwenstein-Jensen medium for the control of sterility of the inoculums and its growth. The compounds were added to the medium in DMSO solutions. The final concentrations were 1000, 500, 250, 125, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2 and 1 $\mu\text{mol/l}$. The MICs were determined after incubation at 37 °C for 14 days. MIC was the lowest concentration of an antimycobacterially effective substance (on the above concentration scale), at which the inhibition of the growth of mycobacteria occurred. The evaluation was repeated three times and the values of the MIC were the same. The minimum inhibitory activity (MIC) of compounds **1** was 16 ($\mu\text{mol/l}$) by 14d incubation and 32 ($\mu\text{mol/l}$) by 24d incubation. The minimum inhibitory activity of compounds **2** was 32 ($\mu\text{mol/l}$) by 14d incubation and 24d incubation as well.

Discussion

The compounds under study form a new group of tuberculostatics. The distance between nitrogen atoms is similar as in amidines,³ which makes it interesting from the scientific point of view. The working group of Beckert has long tradition with amidine pharmacophore in heterocycles. It seems that pharmacophore can be also the 1,2-diaminoethyl group when orientation of nitrogen in torsion angle is approximately 45°.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is a part of the research project No. MSM 0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Tuberculosis Factsheet N°104 – Global and regional incidence. March 2006, Retrieved on 6 October 2006.
2. BUEHRDEL, G., BECKERT, R., PETRÍKOVÁ, E., HERZIGOVÁ, P., KLIMEŠOVÁ, V., FLEISCHHAUER, J., GOERLS, H.: A new synthesis of bis-enaminones via acylation of ketones. *Synthesis*, 2008 (19) 3071–3080.
3. WAISSER, K., BECKERT, R.: Review on antimycobacterial compounds similar to clofazimine. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 38 in press.

Dedicated to Assoc. Prof. Milan Celnáček to his 80th anniversary

ABSTRACT

Derivatives of 2,3-diaminopropazine synthesized and tested in our groups were found to be mostly wide-spectrum antimycobacterial agents. However, other compounds which possess an oxalamidine moiety are also compounds with the antimycobacterial activities. The substitution of an oxalamidine is probably the pharmacophore that is responsible for the antimycobacterial activity of 2,3-diaminopropazines and related compounds.

Keywords: tuberculosis – clofazimine – antimycobacterial activity – quinoxaline – oxalamidine

INTRODUCTION

Clofazimine (I) and related substances are effective wide-spectrum antimycobacterial compounds which are used successfully in treatment of leprosy. Recently, it is often



SEZNAM SLOUČENIN PŘIPRAVENÝCH V PRŮBĚHU
STUDIA

PEZNAM SLOUČENIN PŘIPRAVENÝCH V PRŮBĚHU STUDIA

kód	název
1 T5700	<i>N</i> -(4-brombenzyl)-5-bromsalicylamid
2 T5699	<i>N</i> -(3-brombenzyl)-5-bromsalicylamid
3 T6001	<i>N</i> -(4-brombenzyl)-4-chlorsalicylamid
4 T6002	3-(3,4-dichlorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
5 T6003	6-brom-3-(3,4-dichlorbenzyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
6 T6004	6-chlor-3-(3,4-dichlorbenzyl)- 2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
7 T6021	3-(3,4-dichlorbenzyl)-6,8-dichlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
8 T6022	3-(4-fluorbenzyl)-6-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
9 T6023	<i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
10 T6024	4-chlor- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
11 T6025	5-chlor- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
12 T6026	5-fluor- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
13 T6027	3,5-dibrom- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
14 T6028	3,5-dichlor- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
15 T6029	4-methyl- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
16 T6030	3-methyl- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
17 T6031	5-nitro- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
18 T6032	5-brom- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
19 T6033	2-acetyl-4-methyl- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
20 T6034	3,5-dibrom- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
21 T6035	5-brom- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
22 T6036	5-fluor- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
23 T6037	4-chlor- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
24 T6038	4-methoxy- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
25 T6039	3-(4-brombenzyl)-6-brom-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
26 T6040	3-(4-brombenzyl)-6-brom-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
27 T6041	3-(4-brombenzyl)-6-brom-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
28 T6042	3-(3-brombenzyl)-6-brom-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
29 T6043	3-(3-brombenzyl)-6-brom-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
30 T6044	3-(3-brombenzyl)-6-brom-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
31 T6045	3-(4-brombenzyl)-7-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion

32	T6046	3-(4-brombenzyl)-7-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
33	T6047	3-(4-brombenzyl)-7-chlor-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
34	T6048	4-methyl- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
35	T6049	3,5-dichlor- <i>N</i> -(pyridylmethyl)salicylamid
36	T6050	3-methyl- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
37	T6051	3-methoxy- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
38	T6052	3-methoxy- <i>N</i> -(3-pyridylmethyl)salicylamid
39	T6053	5-chlor- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
40	T6054	4-methoxy- <i>N</i> -(2-pyridylmethyl)salicylamid
41	T6055	cholest-5-en-3-ol(3 β)-3-(6-bromhexanoat)
42	T6056	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy]-6-oxohexyl]pyridin-1-ium-bromid
43	T6057	<i>S</i> -benzylisothiosemikarbazid-hydrochlorid
44	T6058	aceton- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon
45	T6059	<i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazid-hydrobromid
46	T6060	<i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
47	T6061	<i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
48	T6062	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
49	T6063	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon
50	T6064	<i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
51	T6065	<i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
52	T6066	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
53	T6067	<i>S</i> -(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
54	T6068	<i>S</i> -(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
55	T6069	<i>S</i> -(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazid-hydrochlorid
56	T6070	<i>S</i> - 3-(trifluornethyl)benzylisothiosemikarbazidhydrochlorid
57	T6071	3,5-dibromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
58	T6072	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
59	T6073	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
60	T6074	<i>S</i> -benzylisothiosemikarbazid-hydrobromid
61	T6075	3,5-dichlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
62	T6076	3,5-dibromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
63	T6077	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
64	T6078	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon

65	T6079*	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
66	T6080*	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
67	T6081	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
68	T6082	5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
69	T6083	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
70	T6084	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
71	T6085	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
72	T6086	5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
73	T6087	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
74	T6088	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
75	T6089	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
76	T6090	5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
77	T6091	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
78	T6092	ester cholesterolu a kyseliny 16-bromhexanové
79	T6093	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
80	T6094	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
81	T6162	5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
82	T6163	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
83	T6164	5-bromsalicylaldehyd-S-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
84	T6165	5-chlorsalicylaldehyd-S-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
85	T6166	benzaldehyd-S-(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
86	T6167	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
87	T6168	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
88	T6169	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
89	T6170*	1-[3 β -cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxodekahexyl]pyridin-1-ium-bromid
90	T6171	salicylaldehyd-S-(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
91	T6172	salicylaldehyd-S-benzylisothiosemikarbazon
92	T6173	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-benzylisothiosemikarbazon
93	T6174	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-benzylisothiosemikarbazon
94	T6175	5-chlorsalicylaldehyd-S-(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
95	T6176*	3,5-dichlorsalicylaldehyd-S-(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
96	T6177	3,5-dibromsalicylaldehyd-S-(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
97	T6178	5-bromsalicylaldehyd-S-(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon

98	T6179	5-chlorsalicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
99	T6180	ester allobetulinu s kyselinou 6-bromhexanovou
100	T6181	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
101	T6182	6,8-dibrom-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
102	T6183	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid
103	T6184	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]-4-methylpyridin-1-ium-bromid
104	T6185	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
105	T6186	salicylaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
106	T6187	6-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2(<i>3H</i>)-on
107	T6188	6-chlor-3-(4-isopropylfenyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dithion
108	T6189	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-7-chlor-4-thioxo- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2(<i>3H</i>)-on
109	T6190	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-7-chlor- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dithion
110	T6191	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
111	T6192	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
112	T6193	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
113	T6194	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
114	T6195	salicylaldehyd- <i>S</i> -(3-methoxybenzyl)isothiosemikarbazon
115	T6196	salicylaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
116	T6197	5-bromsalicylaldehyd- <i>S</i> -5-benzylisothiosemikarbazon
117	T6198	6-chlor-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
118	T6199*	6-fluor-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
119	T6221	6,8-dichlor-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
120	T6222	7-methyl-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
121	T6223	8-methyl-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
122	T6224*	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]-2-ethyl-pyridin-1-ium-bromid
123	T6225	benzaldehyd- <i>S</i> -(3-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
124	T6226	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-nitrobenzyl)isothiosemikarbazon
125	T6227	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-trifluormethylbenzyl)isothiosemikarbazon
126	T6228	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-fluorbenzyl)isothiosemikarbazon
127	T6229	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-chlorbenzyl)isothiosemikarbazon
128	T6230*	3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
129	T6231	6-brom-3-(3-pyridylmethyl)- <i>2H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(<i>3H</i>)-dion
130	T6232*	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxodekahexyl]-4-methylpyridin-1-ium-bromid

131	T6233	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-methylbenzyl)isothiosemikarbazon
132	T6234	benzaldehyd- <i>S</i> -(4-brombenzyl)isothiosemikarbazon
133	T6235	benzaldehyd- <i>S</i> -benzylisothiosemikarbazon
134	T6236	ester geraniolu s kyselinou 6-bromhexanovou
135	T6237	7-chlor-3-(3-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
136	T6238	7-methoxy-3-(3-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
137	T6239*	8-methyl-3-(2-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
138	T6240	8-methoxy-3-(3-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
139	T6241*	6-chlor-3-(2-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
140	T6242	6-brom-3-(4-isopropylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
141	T6243	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-7-chlor-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
142	T6244	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-7-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
143	T6245	5-fluor- <i>N</i> -(4-isopropyl)salicylamid
144	T6246	6-fluor-3-(4-isopropylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
145	T6247	6-fluor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
146	T6248	6-fluor-3-(4-isopropylfenyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
147	T6249	<i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-5-fluorsalicylamid
148	T6250	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-6-fluor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
149	T6251	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-6-fluor-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
150	T6252	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-6-fluor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
151	T6253	<i>N</i> -(<i>terc</i> -butylfenyl)-5-fluorsalicylamid
152	T6254	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-6-fluor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
153	T6255*	6,8-dibrom-3-(2-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
154	T6256	7-methyl-3-(2-pyridylmethyl)-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
155	T6257	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-6-fluor-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
156	T6258	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-6-fluor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
157	T6259	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-6-chlor-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2(3 <i>H</i>)-on
158	T6260	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-6-chlor-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
159	T6261*	2-[6-(19 β ,28-Epoxy-18 α -oleanan-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]pyridin-1-ium-bromid
160	T6262	fenyl-4-methoxysalicylát
161	T6263	fenyl-3-methoxysalicylát
162	T6264	fenyl-5-bromsalicylát
163	T6265	fenyl-4-chlorsalicylát

164	T6266	fenyl-5-chlorsalicylát
165	T6267	fenyl-5-fluorsalicylát
166	T6268	fenyl-3,5-dibromsalicylát
167	T6269	fenyl-3,5-dichlorsalicylát
168	T6270	fenyl-3-methylsalicylát
169	T6271	fenyl-4-methylsalicylát
170	T6272*	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxodekahexyl]isochinolin-2-ium-bromid
171	T6273*	1-[3 β -Cholest-5-en-3 β -yloxy)-6-oxodekahexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
172	T6274*	2-[6-(19 β ,28-Epoxy-18 α -oleanan-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]3,4-dimethylpyridin-2-ium-bromid
173	T6275	2-isopropyl-5-methylcyklohexyl-6-bromhexanoat
174	T6276	1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yl-6-bromhexanoat
175	T6277*	[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
176	T6278	[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]pyridin-1-ium-bromid
177	T6279	[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid
178	T6280	<i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-4-methylsalicylamid
179	T6281	<i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-4-methylsalicylamid
180	T6282	<i>N</i> -(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-4-methylsalicylamid
181	T6283	3-(4-isopropylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
182	T6284	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
183	T6285	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dion
184	T6286	3-(4-isopropylfenyl)-7-methyl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on
185	T6287	3-(4-isopropylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
186	T6288	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-7-methyl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on
187	T6289	3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
188	T6290	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-7-methyl-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on
189	T6291	3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-7-methyl-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2,4(3 <i>H</i>)-dithion
190	T6292	[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]-4-methylpyridin-1-ium-bromid

191	T6293	2-[6-(19 β ,28-Epoxy-18 α -oleanan-3 β -yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid
192	T6294	[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]isochinolin-2-ium-bromid
193	T6295	[(1R,2S,5R)-(2-isopropyl-methylcyklohex-2-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
194	T6296	[Endo-(1S)-(1,7,7-trimethylbicyklo[2.2.1]heptan-2-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
195	T6297	[Trans-3,7-dimethyl-2,6-oktadien-1-yloxy)-6-oxohexyl]-3,4-dimethylpyridin-1-ium-bromid
196	T6298	[Trans-3,7-dimethyl-2,6-oktadien-1-yloxy)-6-oxohexyl]-pyridin-1-ium-bromid
197	T6299	[Trans-3,7-dimethyl-2,6-oktadien-1-yloxy)-6-oxohexyl]-isochinolin-2-ium-bromid

*sloučeninu se nepodařilo připravit