

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra organické a bioorganické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**SYNTÉZA ANALÓGOV LANSOPRAZOLU S POTENCIÁLNOU
ANTIMYKOBAKTERIÁLNOU AKTIVITOU**

Mária Murínová

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Hradec Králové 2021

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 6.5. 2021

Mária Murínová

Pod'akovanie

Týmto veľmi pekne ďakujem svojmu školiteľovi doc. PharmDr. Jaroslavovi Rohovi, Ph.D. a taktiež Ing. Galine Karabanovich, Ph.D. za odborné vedenie práce, cenné rady, užitočné pripomienky a čas, ktorý mi venovali.

1. OBSAH

1. OBSAH	4
2. ABSTRAKT	6
3. ABSTRACT	8
4. ÚVOD	10
4.1. Tuberkulóza	10
4.2. Liekovo rezistentné tuberkulózy	11
4.3. Liečivá prvej línie používané v štandardnom režime terapie TBC a ich analógy ako potenciálne antituberkulotiká	13
4.3.1. Isoniazid a jeho analógy	13
4.3.2. Rifampicin a jeho analógy	14
4.3.3. Ethambutol a jeho analógy	15
4.3.4. Pyrazinamid a jeho analógy	16
4.4. Liečivá používané v MDR-TBC režimoch	17
4.4.1. Fluorochinolóny	18
4.4.2. Linezolid	19
4.4.3. Bedaquilin	20
4.4.4. Delamanid	21
4.4.5. Q203	21
4.5. Lansoprazol ako ďalšie liečivo so zameraním na cytochróm bc-1	22
4.5.1. Charakteristika lansoprazolu	23
4.5.2. Antimykobakteriálny účinok lansoprazolu	23
4.5.3. Vzťah štruktúry a aktivity lansoprazolsulfidu	24
4.5.4. Farmakokinetika lansoprazol sulfidu	25
5. CIEĽ PRÁCE	26
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
6.1. Chemikálie a prístroje	27
6.2. Praktická časť	28
6.2.1. Syntéza imidazolových analógov LPZS (séria I)	29
6.2.2. Syntéza oxadiazolových analógov LPZS (séria II)	33
6.2.3. Syntéza 1- <i>H</i> -tetrazolových analógov LPZS (séria III)	39

6.2.4.	Syntéza thiadiazolových analógov (séria IV).....	42
6.2.5.	Syntéza triazolového analógu (séria V).....	46
7.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	48
7.1.	Syntéza imidazolových analógov LPZS (séria I)	49
7.2.	Syntéza oxadiazolových, 1 <i>H</i> -tetrazolových a triazolových analógov LPZS (séria II, III a V)	50
7.3.	Syntéza thiadiazolových analógov LPZS (séria IV).....	50
7.4.	Výsledky antimykobakteriálnej účinnosti in vitro.....	51
8.	ZÁVER	56
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV	10
10.	ZOZNAM TABULIEK.....	11
11.	ZDROJE	12

2. ABSTRAKT

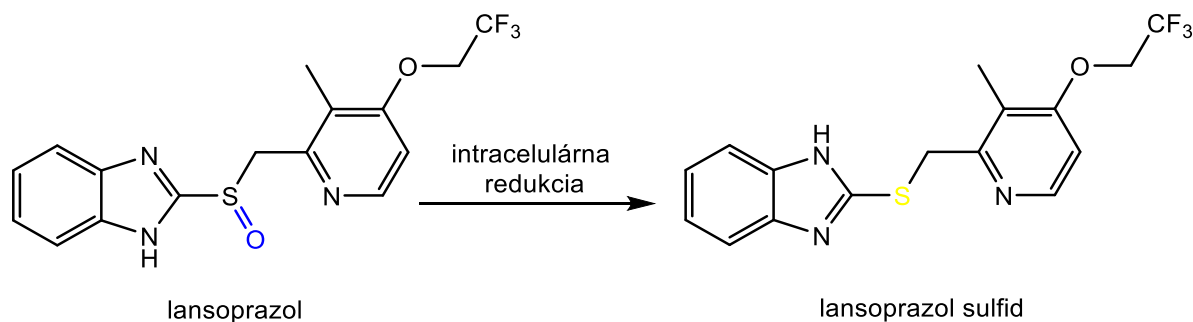
Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

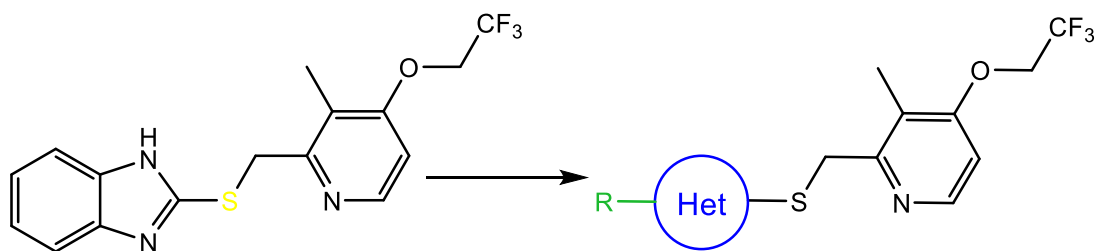
Katedra organickej a bioorganickej chémie

Kandidát: Mária Murínová
Školiteľ: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.
Názov práce: **Syntéza analógov lansoprazolu s potenciálnou antimykobakteriálnou aktivitou**

Mycobacterium tuberculosis je baktéria, spôsobujúca závažné infekčné ochorenie, tuberkulózu. Posledné štúdie ukazujú nárast v počte pacientov trpiacich týmto ochorením, poukazujúc na vzrastajúcu rezistenciu tejto baktérie na väčšinu antibiotík. Vzhľadom k súčasnej globalizácii sveta ako ďalšieho z faktorov, ktorý prispieva šíreniu tuberkulózy aj do oblastí, kde doteraz toto ochorenie bolo pod kontrolou, je priam nevyhnutné zameriavať pozornosť na vývoj nových antituberkulotík. Nedávne štúdie zverejnili, že sľubným kandidátom antituberkulotík je lansoprazol, ktorý je známy predovšetkým v súvislosti inhibítorov žalúdočnej protónovej pumpy. Mechanizmus antimykobakteriálneho účinku spočíva v tom, že lansoprazol po intracelulárnej redukcii na lansoprazol sulfid zabíja *M. tuberculosis* inhibíciou cytochrómu bc-1. To robí z lansoprazol sulfidu vynikajúcu zlúčeninu pre ďalšiu štrukturálnu optimalizáciu a štúdium vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou.



Cieľom tejto práce bolo modifikovať štruktúru lansoprazolu a pripraviť jeho analógy obmenou benzimidazolového heterocyklu. Boli tak pripravené série substituovaných imidazolových, 1,2,4-triazolových, 1,3,4-oxadiazolových, 1,3,4-thiadiazolových a 1H-tetrazolových analógov lansoprazol sulfidu a testovaná ich antimykobakteriálna aktivita proti štandardnému kmeňu *M. tuberculosis* H37Rv a proti *M. avium* a *M. kansasii*.



lansoprazol sulfid

Het: imidazol
1,2,4-triazol
1,3,4-oxadiazol
1,3,4-thiadiazol
1H-tetrazol

3. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

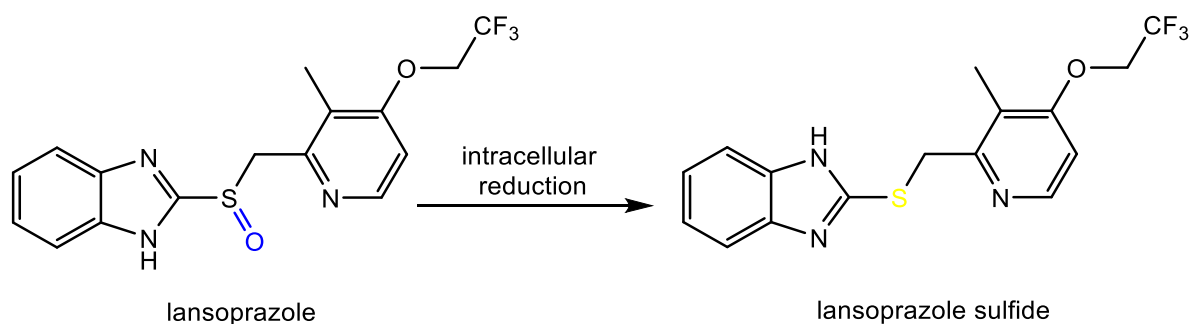
Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Mária Murínová

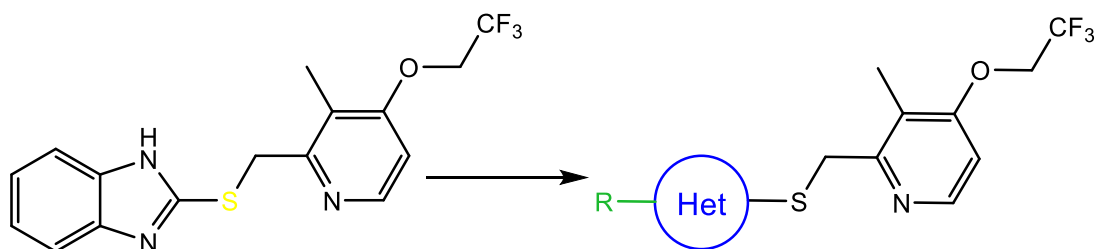
Supervisor: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Synthesis of lansoprazole analogs with potential antimycobacterial activity**

Mycobacterium tuberculosis is a bacterium that causes a serious infectious disease, tuberculosis. Recent studies show an increase in the number of patients suffering from this disease, pointing to the increasing resistance of this bacterium to most antibiotics. Given the current globalization of the world, as another factor contributing to the spread of tuberculosis in areas where the disease has been under control so far, it is essential to focus on the development of new antituberculosis drugs. Recent studies have reported that a promising candidate is lansoprazole, which is known primarily as gastric proton pump inhibitor. The mechanism of the antimycobacterial effect is that lansoprazole, after intracellular reduction to lansoprazole sulfide, kills *M. tuberculosis* by inhibiting cytochrome bc-1. This makes lansoprazole sulfide an excellent compound for further structural optimization and study of its structure-activity relationships.



The aim of this work was to modify the structure of the lansoprazole and to prepare its analogs by altering the benzimidazole heterocycle. Thus, a series of substituted imidazole, 1,2,4-triazole, 1,3,4-oxadiazole, 1,3,4-thiadiazole and 1*H*-tetrazole analogs of lansoprazole sulfide were prepared and tested for their antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv and against *M. avium* and *M. kansasii*.



lansoprazole sulfide

Het: imidazole
1,2,4-triazole
1,3,4-oxadiazole
1,3,4-thiadiazole
1*H*-tetrazole

4. ÚVOD

4.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je prenosné ochorenie, ktoré podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) patrí do rebríčka desiatich najčastejších príčin úmrtí. V roku 2019 spôsobilo toto ochorenie 1,4 milióna úmrtí, vrátane 208 000 ľudí postihnutých HIV, kde súčasná diagnóza TBC je hlavnou príčinou týchto úmrtí.^{1,2} Okrem HIV a iných imunodeficitných stavov sú ďalšími rizikovými faktormi fajčenie, nadmerné užívanie alkoholu a tiež diabetes. TBC vedie na zozname hlavných príčin úmrtí na jedného pôvodcu infekcie, čo znamená, že sa v poradí nachádza aj nad HIV/AIDS.²

Prejav TBC a frekvencia symptómov závisia od toho, či ide o primárnu, či latentnú TBC alebo o reaktiváciu latentnej TBC. Pacienti s primárnou TBC sú často asymptomatickí alebo málo symptomatickí. Symptómy, ktoré sú najčastejšie pozorovateľné a frekvencia ich výskytu u primárnej a reaktivovanej TBC sú znázornené v Tabuľke 1.³

SYMPTÓMY	% postihnutých pacientov	
	Primárna TBC	Reaktivovaná TBC
Kašeľ	23-37	42
Horúčka	18-42	37-79
Stráta hmotnosti	nezaznamenaná	7-24
Hemoptýza	8	9

Tabuľka 1 Prehľad symptómov u primárnej TBC a u reaktivovanej TBC

Pôvodcom tohto ochorenia sú mykobaktérie patriace do komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* a *M. canettii*), ktoré napádajú predovšetkým pľúca, ale výnimkou nie sú ani ostatné tkanivá, u ktorých hovoríme o mimopľúcnej TBC.⁴ Mykobaktérie sa neustále vyvíjajú a čoraz viac odolávajú liečbe, čo vedie k vzniku liekovo rezistentnej TBC.

Kmene *M. tuberculosis*, rezistentné na antibiotiká, ohrozujú pokrok v zvládaní globálnej epidémie. Aj keď sa naoko podľa aktuálnych grafov WHO zdá, že výskyt TBC všeobecne klesá, tak rezistencia naopak stúpa, čo vedie k vyššej chorobnosti, úmrtnosti a v neposlednom rade aj k zvýšeniu nákladov.⁵

Ďalšími, a to nie menej závažnými faktormi, ktoré prispievajú k rezistencii, je nízky sociálno-ekonomický stav, imigračný status a súbežná infekcia inými chorobami (HIV/AIDS, diabetes, plesňové ochorenia), nedodržiavanie liekových režimov, nesprávne používanie alebo nesprávne podávanie liekov.⁶

K rezistencii však prispievajú aj samotné mykobaktérie mechanizmami, akými je napríklad nepriepustnosť bunkového obalu, efluxné pumpy, degradácia a modifikácia liečiva a ďalšie. Pochopenie týchto mechanizmov z molekulárneho, biologického a genetického hľadiska je nevyhnutné pri navrhovaní inovatívnych stratégií v boji proti rezistencii na lieky.⁶

4.2. Liekovo rezistentné tuberkulózy

Spôsob, akým sa mykobaktéria stáva rezistentnou je dvojaký, vlastná a získaná rezistencia.

Vlastná rezistencia vyplýva zo stavby samotnej mykobaktérie, konkrétne jej bunkovej steny, ktorá je zložená z mykolových kyselín a tie sú veľmi málo permeabilné pre akékoľvek terapeutické činidlo. Pri dlhodobom vystavení nízkodávkovým liekom dochádza v bunke k zvýšenej aktivácii transportných proteínov a tým k vyššej exprimácii, a bunka sa tak stáva nenávratne rezistentnou.⁷

Ďalším spôsobom, a to oveľa závažnejším, je získaná rezistencia. Problém spočíva v tom, že nesprávne zvolená liečba alebo nízkodávkové režimy indukujú v mykobaktérii génové mutácie v cieľových štruktúrach bunky, kde dané liečivo pôsobí. Kmene s takto získanou rezistenciou sú prenosné a v ďalších pacientoch môžu získavať ďalšie mechanizmy rezistencie. Podľa toho, na ktoré liečivá je mykobaktéria rezistentná, rozlišujeme RR-TBC (rifampicin rezistentná tuberkulóza), MDR-TBC (multirezistentná tuberkulóza) a XDR-TBC (extenzívne rezistentná tuberkulóza).

V roku 2019 bolo zistených a oznámených celkovo 206 030 ľudí s MDR / RR-TBC, čo predstavuje 10% nárast zo 186 883 v roku 2018 a na liečbu bolo zaradených 177 099 osôb,

čo je nárast zo 156 205 od roku 2018. Posledné údaje hlásené WHO o úspešnosti liečby MDR-TBC dosahujú 57% úspešnosť, čo stále nie je uspokojivý výsledok a znamená to, že inovácie v terapii sú neustále potrebné, aby sa dosiahlo zníženie výskytu TBC na celom svete na úrovne, ktoré sa už dosiahli v niektorých krajinách s nízkym zaťažením, kde sa už TBC považuje za chorobu minulosti.²

RR-TBC je rezistentná len voči rifampicinu a nie liečivám z druhej či tretej línie. MDR-TBC je forma tuberkulózy spôsobená baktériami, ktoré neodpovedajú na isoniazid a rifampicin, čo sú 2 najúčinnšie lieky prvej voľby proti TBC. Liečba RR-TBC a MDR-TBC je zvyčajne dlhšia a pozostáva z vybraných liekov prvej voľby spolu s rôznymi kombináciami liekov druhej voľby, medzi ktoré patria fluorochinolóny (levofloxacin, ofloxacin), injekčné liečivá (amikacin, capreomycin, kanamycin) a ďalšie (ethionamid/protionamid, cykloserin/terizidon, linezolid, klofazimin). V nevyhnutných prípadoch je možné použiť aj doplnkové liečivá, medzi ktoré patria napríklad bedaquilin, delamanid a ďalšie.⁶ Tieto možnosti sú však obmedzené a vyžadujú dlhodobú terapiu – až 2 roky liečby liekmi, ktoré sú drahé a pri dlhodobom užívaní zle znášateľné. V súčasnosti je možné aplikovať aj skrátený režim v trvaní 9 - 12 mesiacov, ktorý doporučila WHO. Pred začatím liečby týmto režimom je vždy potrebné vylúčiť rezistenciu na fluorochinolóny. Z hľadiska adherencie je pre pacientov tento skrátený režim ľahšie absolvovateľný.⁸

XDR-TBC je závažnejší poddruh MDR-TBC. Rezistencia tohto druhu spočíva v minimálnej odpovedi na liečbu rifampicinom, isoniazidom, fluorochinolonom a tiež k injekčnému liečivu druhej voľby.⁶ Liečba takto rezistentnej TBC je konzultovaná od prípadu k prípadu a musí byť konzultovaná medzi odborníkmi.⁹ Našťastie však výskyt takto rezistentnej TBC oproti MDR / RR-TBC nie je až tak frekventovaný.²

Jednou z inovácií v terapii rezistentných TBC je napríklad použitie už existujúceho lieku a jeho analógov, čo znižuje náklady na vývoj lieku a zároveň skracaje dobu výskumu. Na túto myšlienku bolo zameraných viacero výskumov, kde bolo hlavným cieľom „vylepšiť“ už existujúce liečivá používané v terapii TBC.

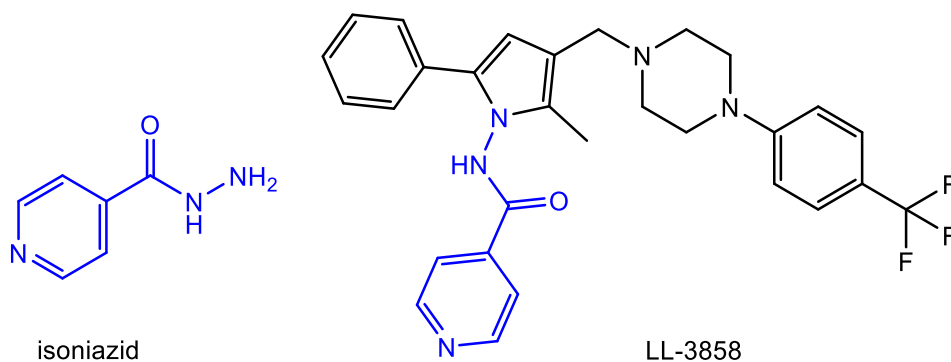
Nové antituberkulotikum by tak všeobecne malo mať vlastnosti ako vyššiu aktivitu, zníženú toxicitu, krátku dobu liečby, vyhýbať sa významným liekovým interakciám s liečivami aktuálneho režimu, mať efekt na MDR-TBC, XDR-TBC a tiež vynikať novým mechanizmom účinku.¹⁰

4.3. Liečivá prvej línie používané v štandardnom režime terapie TBC a ich analógy ako potenciálne antituberkulotiká

V súčasnosti je odporúčanou liečbou na TBC citlivej na lieky 6 - 9 mesačný režim, s použitím kombinácie liekov prvej voľby: rifampicin, ethambutol, pyrazinamid a isoniazid, kde štvorkombinácia týchto liečiv je podávaná po dobu 2 mesiacov a nasledujúce 4 mesiace je podávaná dvojkombinácia isoniazidu s rifampicinom. Úspešnosť takto nastavenej liečby u TBC citlivej na tieto liečivá je najmenej 85%.²

4.3.1. Isoniazid a jeho analógy

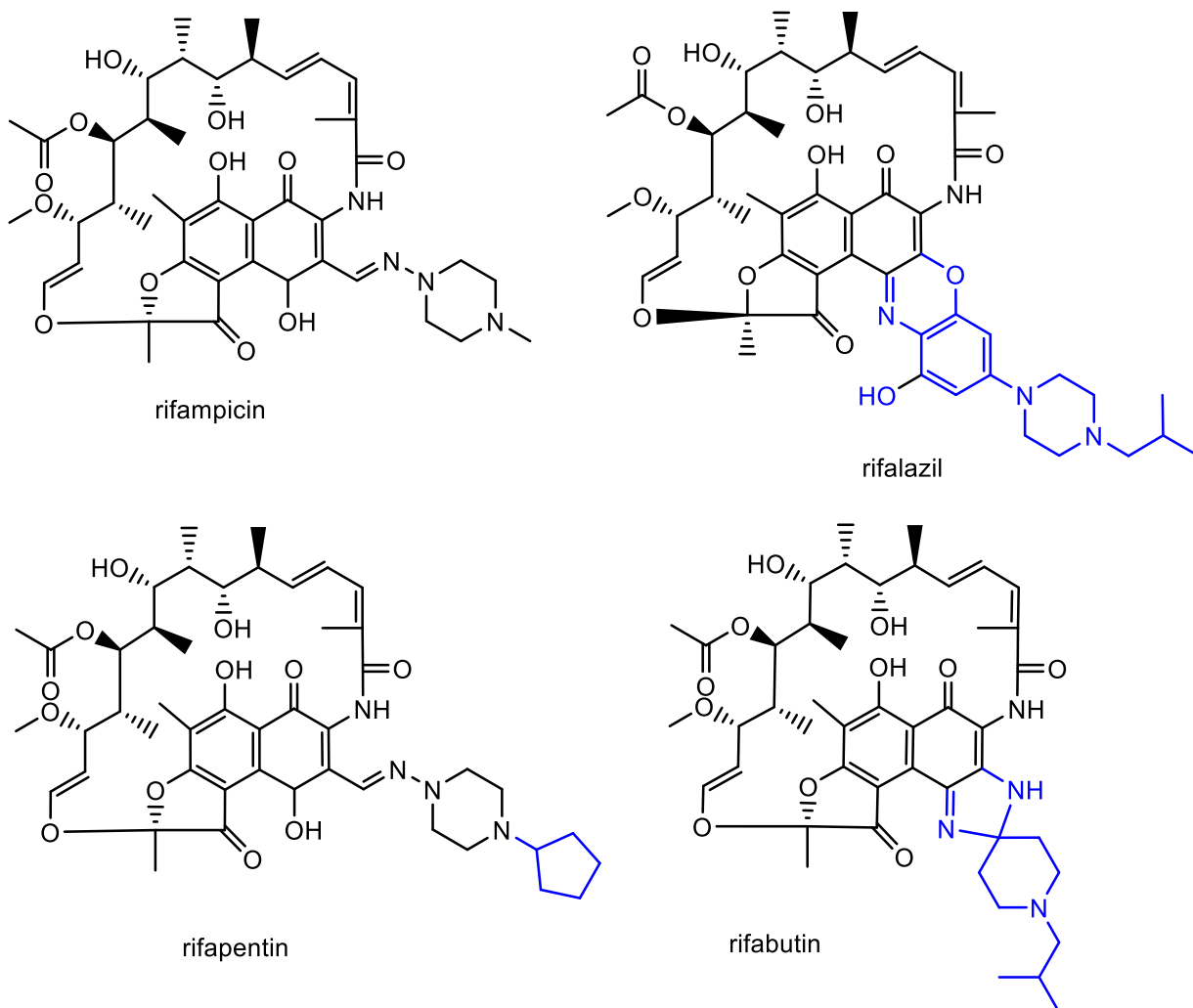
Isoniazid patrí medzi jednu z najúčinnějších zlúčenín v terapii TBC. Aj keď štruktúra molekuly je na prvý pohľad jednoduchá (Obrázok 3), mechanizmus účinku je oveľa zložitejší a komplexnejší. Spočíva v ovplyvnení viacerých mechanizmov. Isoniazid je proliečivom, ktoré je aktivované katalázou – peroxidázou a aktívna molekula ďalej inhibuje enzým, konkrétne enoyl-ACP reductázu, čo má za následok inhibíciu tvorby mastných kyselín, vrátane mykolových kyselín, ktoré sú podstatnou zložkou bunecnej steny mykobaktérií. Hlavnou príčinou rezistencie mykobaktérie je génová mutácia najmä v týchto enzýmoch. Dôsledkom je tak hromadenie neaktívnej formy liečiva, ktoré nie je schopné inhibície enzýmu, zodpovedného za syntézu bunkovej steny, čím dáva mykobaktériám šancu na prežitie.¹¹ V snahe potlačiť rezistenciu bola pripravená rada derivátov isoniazidu. Na molekulu isoniazidu boli pripojené hlavne lipofilné fragmenty, čo zvyšuje permeáciu molekuly cez bunkovú stenu mykobaktérií. Sľubne vypadá lipofilný derivát isoniazidu, zlúčenina pod označením LL- 3858, kde k základnej štruktúre isoniazidu bol naviazaný substituovaný pyrrolový fragment (Obrázok 1). Daná zlúčenina sa už nachádza v počiatočných fázach klinického testovania. Výhodou je, že vykazuje aktivitu aj voči MDR-TBC.¹²



Obrázok 1 Isoniazid a jeho analóg LL-3858

4.3.2. Rifampicin a jeho analógy

Rifampicin ako jedno z kľúčových liečiv účinkuje na princípe inhibície predĺženia reťazca RNA, tým, že sa naviaže na RNA-polymerázu a ovplyvňuje tak transkripčné procesy v bunke, čím ju nakoniec usmrtí. Svojou makrocyclickou štruktúrou sa radí medzi ansamyciny, ktoré sú lipofilné a dokážu tak prestúpiť aj cez hematoencefalickú bariéru. Do tejto skupiny patrí okrem rifampicinu aj rifabutin, rifapentin, a tiež rifalazil, ktorý síce vykazoval vyššiu aktivitu, ale kvôli závažným vedľajším účinkom bol vyradený z klinického testovania. Naopak rifabutin sa osvedčil v terapii nielen TBC citlivej na lieky, kde nie je možné použiť rifampicin, ale tiež v terapii MDR-TBC ako doplnkové liečivo, či súčasťou liekového režimu XDR-TBC. Zaujímavou molekulou z rady ansamycinov je aj rifapentin, ktorý je využívaný v prevencii latentnej TBC u pacientov s HIV, kde jeho podávanie po dobu jedného mesiaca sa vyrovná preventívnemu užívaniu isoniazidu po dobu šiestich týždňov.⁷

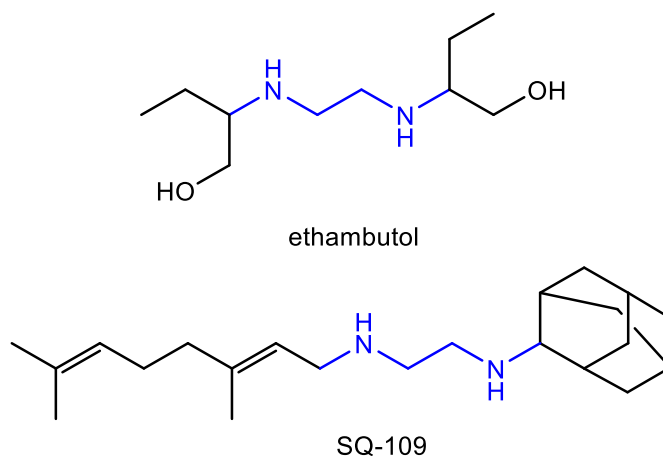


Obrázok 2 Rifampicin a jeho analógy

4.3.3. Ethambutol a jeho analógy

Ethambutol je schopný inhibovať arabinofuranosyltransferázu, ktorá sa tiež podieľa na tvorbe mykobakteriálnej steny syntézou arabinogalaktanov, čím zvyšuje permeabilitu bunkovej steny. U ethambutolu sa taktiež objavuje stúpajúci trend v rezistencii. Viac než polovica MDR-TBC prípadov je rezistentných na ethambutol.¹³ Po analýze genómu rezistentných izolátov bolo zistených niekoľko polymorfizmov ovplyvňujúcich gény, ktoré sa podieľajú na metabolizme aminocukrov, nukleotidových cukrov, metabolizme síry a ďalších, čo v konečnom dôsledku ovplyvňuje syntézu zdrojov uhlíka a energie pre mykobaktérie.¹⁴ Opäť v snahe potlačiť rezistenciu ethambutolu, bolo pripravených niekoľko analógov

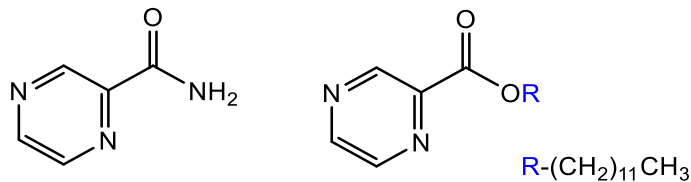
s lipofilnými asymetrickými diamínmi a s objemnými hydrofóbnymi fragmentami, z ktorých najslubnejší je analóg SQ-109 (Obrázok 3).



Obrázok 3 Ethambutol a jeho analóg SQ-109

4.3.4. Pyrazinamid a jeho analógy

Pyrazinamid má špecifické postavenie v terapii TBC, vzhľadom na jeho účinok na latentnú formu TBC v kyslom prostredí, čím ostatné antituberkulotiká nevynikajú. Má nezastupiteľné miesto aj v terapii MDR-TBC a XDR-TBC v kombinácii s inými liekmi. Podľa prieskumov však hrozí čoraz vyššia rezistencia aj na sám pyrazinamid. Jeho účinok súvisí s enzymatickou premenou vďaka pyrazinamidáze na kyselinu pyrazinovú, ktorá inhibuje syntézu mastných kyselín v mykobaktériach. Mechanizmus je stále predmetom výskumu a zdá sa, že v mykobaktérii zasahuje viac cieľov.¹⁵ Na základe tohto mechanizmu boli pripravené estery kyseliny pyrazinovej, kde sa predpokladalo, že lipofilná esterová skupina vykáže lepšiu penetráciu cez bunkovú stenu. Na zlepšenie stability voči buncenej hydrolyze boli pripravené estery s dlhým reťazcom. Prekvapivé bolo zistenie, že niektoré sú 10-100 -krát účinnejšie než samotný pyrazinamid, pričom najaktívnejší z nich je ester s 12 - uhlíkovým reťazcom. Ďalšou vynikajúcou vlastnosťou je, že sa podávajú inhalačne priamo do postihnutého pľúcneho tkaniva, čím sa obmedzí veľké systémové zaťaženie a tiež sa minimalizujú vedľajšie nežiaduce účinky na gastrointestinálny trakt či pečeň.¹⁶



Obrázok 4 Pyrazinamid a jeho lipofilný ester

4.4. Liečivá používané v MDR-TBC režimoch

V roku 2019 boli WHO vydané nové konsolidované usmernenia v prístupe liečby MDR-TBC a XDR-TBC. Liečivá, ktoré sa používajú v režime terapie MDR-TBC radíme do druhej línie a sú zoskupené do troch skupín, na základe najnovších dôkazov o ich bezpečnosti a účinnosti. (Tabuľka 2). Napríklad injekčné liečivá sú rizikové z hľadiska ototoxicity a nefrotoxicity, preto sú zaradené do skupiny C, hoci vykazujú lepšie výsledky než samotná perorálna terapia s výnimkou kanamycinu a kapeomycinu, ktoré boli spojené s nižšou účinnosťou a kapeomycin navyše s vyššou úmrtnosťou.¹⁷

Jeden zo skrátených režimov pozostávajúci z perorálnych liekov (bedaquilin, pretomanid, linezolid) dosiahol 85-90% mieru vyliečenia po šiestich mesiacoch trvania liečby. Aby sa zachovala úspešnosť tohto režimu, je potrebné používať tieto lieky s opatrnosťou, aby sa minimalizovala rezistencia, hlavne v krajinách, kde je už používanie bedaquilinu v širokom rozsahu.¹⁸

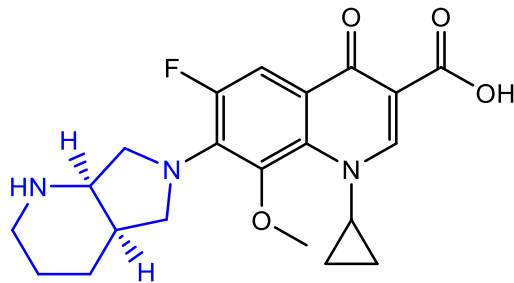
Ďalší z testovaných režimov je navrhnutý ako potenciálne kratší univerzálny režim, pozostávajúci z bedaquilinu, pretomanidu, moxifloxacinu a pyrazinamidu. V štúdiách sa ukázalo, že k vyliečeniu došlo po 2 mesiacoch, čo je trikrát kratšia doba než pri aktuálnom štandardnom režime. Je viac než pravdepodobné, že v budúcnosti nebude len jeden štandardný režim, tak ako je tomu pri TBC citlivej na lieky, ale daná kombinácia bude závisieť od jednotlivých prípadov.¹⁸

Skupina	Liečivá	Charakteristika
A	levofloxacín, moxifloxacín, bedaquilín, linezolid	Lieky, ktoré majú byť uprednostňované
B	klofazimín, cykloserín, terizidón	Lieky, ktoré majú byť pridané do liečebného režimu ako ďalšie
C	ethambutol, delamanid, pyrazinamid, amikacín, streptomycín, protónamid, etionamid	Lieky, ktoré sa majú zahrnúť do dokončenia režimov a pri nemožnosti použitia liekov zo skupiny A a B

Tabuľka 2 Klasifikácia liečiv pre terapiu MDR-TB

4.4.1. Fluorochinolóny

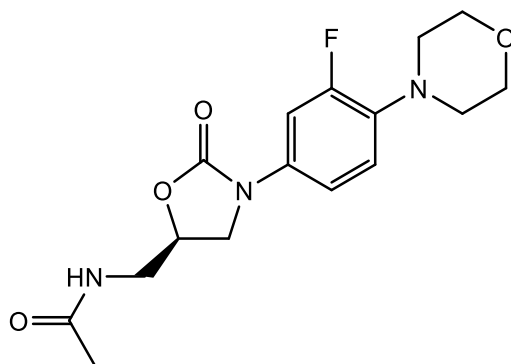
Sú širokou skupinou antibiotík, ktoré využívajú inhibíciu topoisomeráz k tomu, aby inhibovali DNA replikáciu a transkripciu. Ich zacielenie na gram-negatívne aj gram-pozitívne baktérie im zabezpečuje širokú škálu indikácii ako infekcie dýchacích ciest, gastrointestinálneho traktu či gynekologických infekcií. Pri infekcii *M. tuberculosis* je v druhej línii využívaný levofloxacin, ciprofloxacin a ofloxacin a ako ďalší kandidáti zo štvrtej generácie moxifloxacin a gatifloxacin. Moxifloxacin vykazuje dobré výsledky u pacientov, ktorí netolerujú žiadne liečivo z prvej línie, ale chýba mu schopnosť skrátiť celkovú dobu liečby. Uhlík v polohe 7 (Obrázok 5) je atraktívnym miestom, kde po naviazaní substituentov (napr. izatínu, azolu, hydrazónu, hydrazidu a iných) je výrazne pozitívne ovplyvnený biologický profil.¹⁹



Obrázok 5 Štruktúra moxifloxacinu

4.4.2. Linezolid

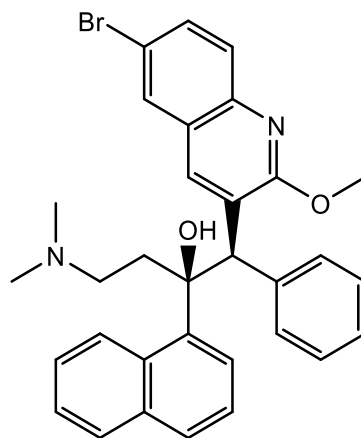
Linezolid je antibiotikum pôsobiace na 50S podjednotke ribozómu a okrem účinku na gram-pozitívne baktérie má aj antimykobakteriálny efekt. Čo sa týka vzťahu štruktúry a aktivity linezolidu, tak najväčší podiel na aktivite má (*S*)-konfigurácia na C-5 oxazolidinového kruhu. Pre aktivitu je ďalej potrebný N-arylový kruh a taktiež substitúcia atómom fluóru.¹⁹ Jeho širokému užívaniu bráni profil nežiadúcich vedľajších účinkov, ktorými sú napríklad periférna neuropatia, myelosupresia, trombocytopénia a ďalšie.



Obrázok 6 Štruktúra linezolidu

4.4.3. Bedaquilin

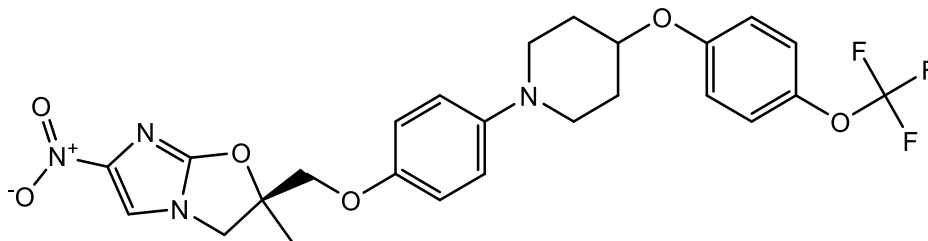
Bedaquilin je nová molekula patriaca do skupiny diarylcholínov a vyznačuje sa novým mechanizmom účinku so zacielením na energetický metabolizmus mykobaktérií. Blokuje miesta viažuce ióny na ATP-syntáze s vysokou selektivitou na mykobakteriálnu ATP-syntázu (až 20 000 krát viac než na ľudskú ATP-syntázu), čím sa minimalizuje negatívne ovplyvnenie ostatných ľudských buniek pri liečbe. Hoci mykobaktéria dokáže prežiť stav hypoxie, za žiadnych okolností, ani jeden druh mykobaktérií (aktívnych / neaktívnych, fermentujúcich / nefermentujúcich) nedokáže prežiť bez ATP, energetickej molekuly. Táto vlastnosť pôsobiť na mykobaktérie vo všetkých stavoch, výrazne ovplyvnila aj dobu liečby TBC. Za daný účinok je zodpovedná konfigurácia dvoch stereocentier (1R, 2S), tiež terciárna aminoskupina s dvoma methylmi, halogén naviazaný na fenylovom kruhu a tiež bróm a methoxy skupina na chinolínovom kruhu prispievajú k danej aktivite.¹⁹ Značnou nevýhodou je však inkompatibilita pri súčasnom podávaní antiretrovírusovej liečby a tiež významné predĺženie QT-intervalu, ktoré však podľa posledných štúdií je závažné až pri súčasnom podávaní s liekmi, ktoré tento nežiadúci jav znásobujú. Tieto nevýhody obmedzili používanie bedaquilinu na MDR-TBC len v nevyhnutných prípadoch, kedy iné možnosti liečby nezaberajú alebo je nemožné ich použiť.^{18,20,21}



Obrázok 7 Štruktúra bedaquilinu

4.4.4. Delamanid

Patrí do skupiny nitroimidazolov, ktoré boli už dávnejšie používané pri terapii ochorení ako napríklad anaeróbných infekcií (eradikácia *H. pylori*), či protozoálnych infekcií. Tieto zlúčeniny boli proti *M. tuberculosis* neúčinné. Aj napriek tomu bolo neskôr zistené, že nitroimidazolová zlúčenina pod názvom pretonamid, vykazuje istú aktivitu voči MDR-TBC. Následná štruktúrna obmena viedla až k vzniku zlúčeniny, ktorú dnes poznáme pod názvom delamanid. Obe zlúčeniny účinkujú podobným spôsobom, kedy musia byť najskôr aktivované a následnou redukciou vznikajú metabolity, u ktorých sa odhaduje daný účinok vďaka vzniku oxidu dusnatého, ktorý okrem iného poškodzuje aj lipidy bunkovej steny a narušuje tak ich permeabilitu. Účinok je teda závislý hlavne na nitroskupine naviazanej na imidazooxazolovom heterocykle.¹⁹

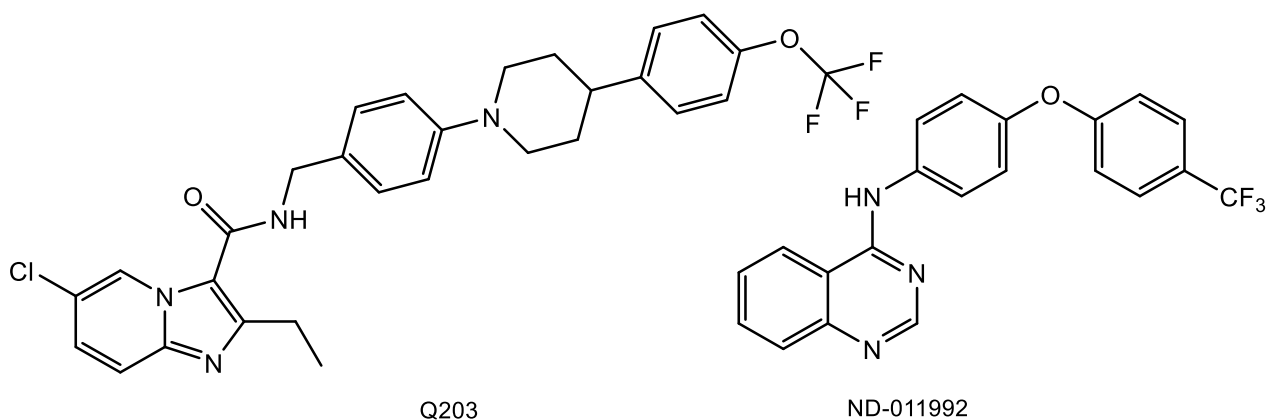


Obrázok 8 Štruktúra delamanidu

4.4.5. Q203

Q203 (Telacebac) je zlúčenina, ktorá je aktuálne v II. fáze klinického testovania. Patrí do skupiny imidazopyridínov a nevyznačuje sa žiadnym chirálnym centrom, čím by sa celkovo znížili výrobné náklady a zvýšila dostupnosť tohto liečiva hlavne v rozvojových krajinách s nižším príjmom. Rozhodujúcim pre antimykobakteriálnu aktivitu je karboxamid s *N*-benzylom. Pozitívny vplyv má aj lipofilný mostík spájajúci benzylovú skupinu s fenylou.¹⁹ Takto koncipovaná štruktúra pôsobí na cytochróm bc-1, ktorý je súčasťou elektrónového transportného reťazca. Tým je mykobaktéria odkázaná na energeticky menej výhodný cytochróm bd, čoho výsledkom je len bakteriostatický účinok. Táto skutočnosť spolu s myšlienkou zacielenia aj na menej energetický cytochróm odhalila výborný cieľ pre ďalšie

antituberkulózne lieky.²² Následným skríningom bol objavený aj inhibítor cytochrómu bd (ND-011992), ktorý sám o sebe nemá účinok, ale v kombinácii s telacebacom pôsobí baktericídne.²³



Obrázok 9 Štruktúra telacebacu a inhibítora bd - ND-011992

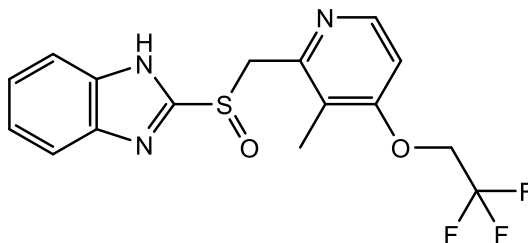
4.5. Lansoprazol ako ďalšie liečivo so zameraním na cytochróm bc-1

Terminálny oxidačný reťazec sa stal natoľko atraktívnym cieľom pre návrh nového antituberkulotika, že naň vedci začali viac upriamovať pozornosť.¹⁰ Mykobaktérie majú rozvetvený aeróbný dýchací reťazec, v ktorom elektróny prúdia z dehydrogenáz až do cytochrómu c oxidázy cez komplex cytochróm bc-1 alebo priamo na cytochróm bd menachinol oxidázu, ktorá tak vystupuje ako záložný zdroj energie a tiež vďaka nemu v niektorých patogénoch podporuje virulenciu, čím sa stáva zaujímavým potenciálnym cieľom pre liečivá.^{24,25}

Pri jednom z experimentov, kde pľúcne fibroblasty boli infikované mykobaktériami a následne použité pre skríning viac než 1000 liečiv schválených FDA, bol lansoprazol identifikovaný ako účinná zlúčenina, ktorá chráni fibroblasty v hladinách porovnateľných s dobre účinnými antibakteriálnymi zlúčeninami.¹⁰ A práve mechanizmus tohto účinku je podobný s účinkom telacebacu, kde sa lansoprazol viaže na cytochróm bc-1 a bráni tak vzniku energetickej molekuly, bez ktorej mykobaktéria nie je schopná prežiť v žiadnom stave.

4.5.1. Charakteristika lansoprazolu

Lansoprazol patrí do skupiny inhibítorov protónovej pumpy, ktoré sú indikované v terapii žalúdočných vredov, refluxnej esofagitídy či Zollinger-Ellisonovho syndrómu. Je to nestabilná zlúčenina, u ktorej je k účinku potrebná konverzia na sulfénovú kyselinu, prípadne sulfenamidový medziprodukt v kyslom prostredí žalúdka.²⁶ Vďaka tomu sa dokáže naviazať na väzbové miesta H^+/K^+ -ATPázy a tým inhibuje produkciu žalúdočnej kyseliny. Po chemickej stránke ide o lipofilnú a slabú bázu (Obrázok 10) s biologickou dostupnosťou 80-85 %. V závislosti od indikácie sa podáva obvykle jedenkrát denne v dávke 30 mg.²⁷



Obrázok 10 Štruktúra lansoprazolu

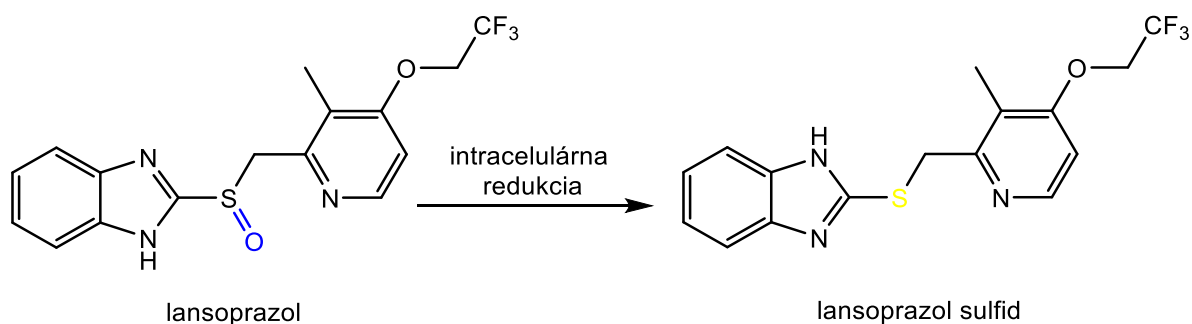
4.5.2. Antimykobakteriálny účinok lansoprazolu

Antibakteriálny mechanizmus lansoprazolu je odlišný, prebieha výhradne v intracelulárnom prostredí mykobaktérie konverziou na lansoprazol sulfid (LPZS), pričom sa nevytvára kyselina sulfénová potrebná na viazanie na žalúdočnú H^+/K^+ -ATPázu (Obrázok 11).¹⁰

Cieľom takto aktívneho metabolitu je cytochróm bc-1, čo potvrdzuje aj priame meranie hladiny ADP – prekursoru energetickej molekuly ATP, u mykobatérií liečených a neliečených LPZS. Výsledná hodnota pomeru ADP/ATP bola približne sedemkrát vyššia u liečených mykobaktérií než u neliečených. Tento fakt je obzvlášť zaujímavý v tom, že proteínová štruktúra H^+/K^+ -ATPázy je výrazne odlišná od cytochrómu bc-1.¹⁰

Zatiaľ nie sú dostupné dôkazy o tom, či by mal lansoprazol priaznivý účinok, ak by sa podával ľuďom, u ktorých je diagnostikovaná tuberkulóza. Existuje však kohortová štúdia, ktorá dokazuje menšiu mieru incidencie TBC u pacientov užívajúcich lansoprazol, než

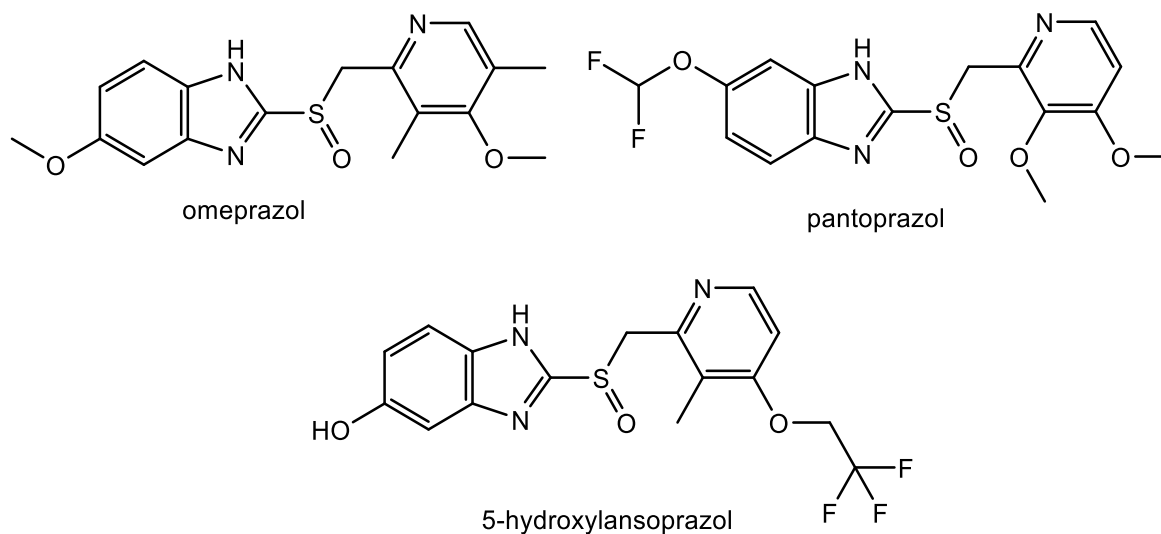
u užívateľov omeprazolu či pantoprazolu. Nebolo však zistené, či ochorenie bolo spôsobené reaktiváciou latentnej TBC, alebo v dôsledku nedávnej infekcie.²⁸ Štúdie in vitro, testovanie na zvieratách či vyššie spomínané klinické testy však podškrávajú účinok lansoprazolu voči *M. tuberculosis*. Taktiež to potvrdzuje aj antibiotický profil, ktorý vykazoval veľmi dobrú aktivitu voči niektorým izolátom rezistentným na liečivá. U *M. tuberculosis H37Rv* bola minimálna inhibičná koncentrácia, teda najnižšia koncentrácia, ktorá zastavuje rast mykobaktérií, 1,13 $\mu\text{mol/l}$.¹⁰



Obrázok 11 Intracelulárna redukcia lansoprazolu na lansoprazol sulfid

4.5.3. Vzťah štruktúry a aktivity lansoprazol sulfidu

Pri spomínanom experimente s infikovanými pľúcnyimi fibroblastami boli spolu s lansoprazolom skúmané aj ostatné príbuzné (5-hydroxylansoprazol) a široko používané inhibítory protónovej pumpy (omeprazol, pantoprazol). Tieto látky však neboli úspešné v koncentrácii, v ktorej lansoprazol vykazoval antimykobakteriálnu účinnosť (10 μM). Dokonca ani substitúcia hydroxylovou skupinou na piatom uhlíku benzimidazolového kruhu nevykazovala žiadny pozitívny výsledok, čo vedie k predpokladu, že akákoľvek substitúcia na benzimidazolovom kruhu znižuje účinok molekuly (Obrázok 12).



Obrázok 12 Štruktúry omeprazolu, pantoprazolu a 5-hydroxylansoprazolu

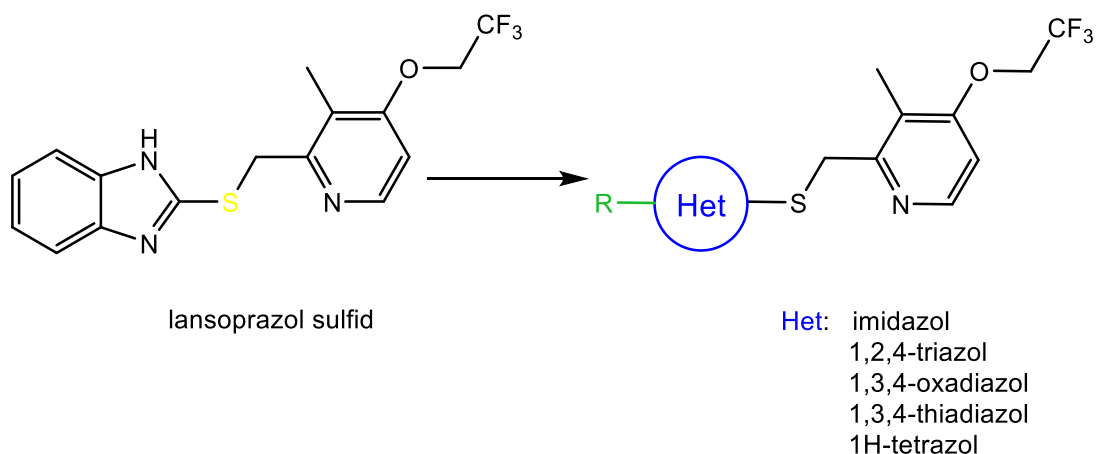
4.5.4. Farmakokinetika lansoprazol sulfidu

Čo sa týka spôsobu podania lansoprazolu, existujú protichodné zdroje o účinku perorálne podaného liečiva. Niektoré uvádzajú, že perorálne podanie je z hľadiska eliminácie mykobaktérií najvýhodnejšie a iné zasa, že pri perorálnom podaní by sa musela podať dávka vyššia než 300 mg, aby sa dosiahlo danej koncentrácie a účinku v tkanivách, čo už je dávka, ktorá je ľudským organizmom netolerovateľná a je s ňou spojených mnoho vedľajších účinkov.²⁹

5. CIEĽ PRÁCE

Táto práca nadväzuje na štúdiu, v ktorej bolo zistené, že metabolit lansoprazolu – lansoprazol sulfid – vykazuje antimykobakteriálne účinky.

Predpoklad, že pri podaní štandardnej dávky lansoprazolu bude v organizme adekvátne množstvo lansoprazol sulfidu, nebol naplnený. V nadväznosti na popísané skutočnosti a vzhľadom na to, že ani substitúcia benzimidazolového kruhu neprispieva k vyššej antituberkulózneho aktivity, bolo našim cieľom obmeniť benzimidazolový heterocyklus za ďalšie heterocykly a následne otestovať ich aktivitu in vitro.



Obrázok 13 Všeobecná štruktúra analógov lansoprazol sulfidu pripravených a študovaných v tejto práci

6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

6.1. Chemikálie a prístroje

Pri syntéze boli použité komerčne dostupné chemické látky a rozpúšťadlá firmy Sigma-Aldrich bez ich ďalšej purifikácie.

Reakcie boli monitorované pomocou tenkovrstvej chromatografie (TLC hliníkové dosky Merck silica gel 60 F₂₅₄). Mobilná fáza bola zvolená vždy podľa charakteru reakcie, najčastejšie však používaná sústava hexán:ethyl-acetát, v pomere 1:3. Detekcia bola prevádzaná pod UV žiarením pri vlnových dĺžkach 254 a 366 nm. Ako stacionárna fáza pri stĺpcovej chromatografii bol použitý Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

Pre meranie teploty topenia bol použitý prístroj Kofler block alebo Büchi B-545 bez ďalšej korekcie.

Čistota pripravených látok bola overená pomocou ¹H a ¹³C NMR spektier, ktoré boli merané VNMR S500 NMR spektrometrom alebo JNM-ECZ 600R NMR spektrometrom. Hodnoty chemického posunu δ [ppm] v ¹H a ¹³C spektrách sú nepriamo vzťahované k tetramethylsilanu ako vnútornému štandardu.

UHPLC systém Acquity UPLC I-class (Waters, Milford) spojený so spektrometrom (HRMS) Q-TOF Synapt G2Si (Waters, Manchester, U.K.) bol využitý k meraniu HRMS spektier.

Názvy zlúčenín boli vygenerované programom ChemDraw 19.1 a preložené do slovenského jazyka podľa pravidiel. Taktiež pomocou tohto programu boli vygenerované jednotlivé chemické vzorce, reakčné schémy a tiež analytické údaje ako napríklad molekulárna hmotnosť.

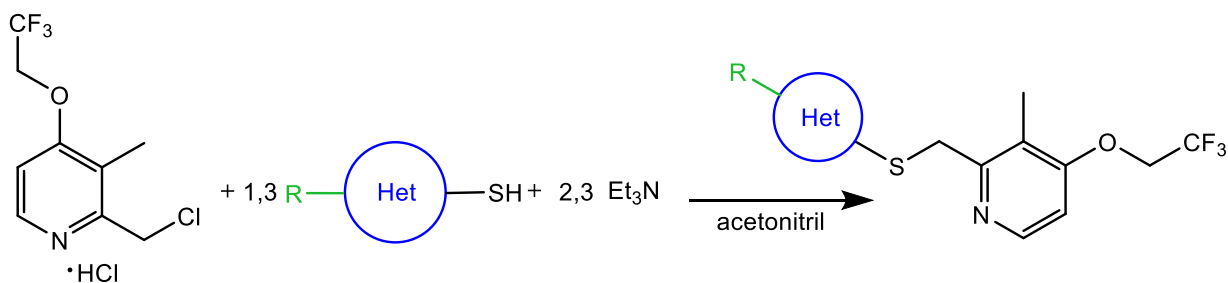
6.2. Praktická časť

Nasledujúce série I-V boli pripravené podľa všeobecného postupu popísaného nižšie za využitia alkylačnej reakcie. Väčšina vstupných heterocyklických thiolov bola pripravená na katedre v predchádzajúcich rokoch. Niektoré boli pripravené podľa nasledujúcich postupov uvedených v príslušných kapitolách jednotlivých sérií. Ako alkylačné činidlo bol použitý komerčne zakúpený 2-(chlormethyl)-3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridinium chlorid.

Všeobecný postup prípravy látok série I-V

Všeobecná schéma tejto prípravy spočíva v jedнокrokovvej syntéze, kedy k jednému ekvivalentu alkylačného činidla – substituovaného pyridínium chloridu je pridaných 1,3 ekvivalentu heterocyklického thiolu a 2,3 ekvivalentu triethylamínu v prostredí acetonitrilu (5-10 ml). Reakcia prebieha po dobu 12-36 hodín za izbovej teploty a priebežne je kontrolovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie. Po ukončení reakcie je rozpúšťadlo odparené pomocou vákuovej odparky. Čistenie látok prebieha pomocou extrakčnej metódy, kedy odparok je rozpustený v ethyl-acetáte (40-50 ml) a takto pripravená organická fáza je pretrepaná s vodnou, ktorú tvorí nasýtený roztok NaHCO₃ (2 × 30 ml) a konečne s nasýteným roztokom NaCl (1 × 20 ml). Ethyl-acetátová fáza je nakoniec vysušená pomocou bezvodého síranu sodného a zakoncentrovaná na vákuovej odparke. Pri prítomnosti viacerých produktov reakcie je použitá stĺpcová chromatografia na ich oddelenie.

Všeobecná schéma:

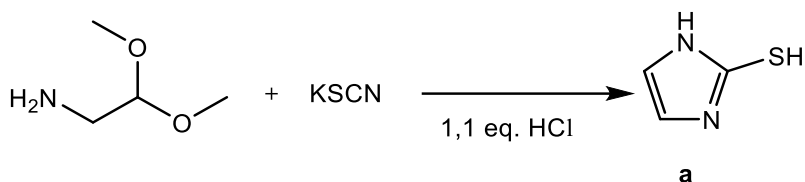


6.2.1. Syntéza imidazolových analógov LPZS (séria I)

6.2.1.1. Príprava reaktantov

Príprave oboch imidazolových analógov LPZS **1** a **2**, predchádzala syntéza vstupných reaktantov, imidazol-2-thiolu (**a**) a 1-benzylimidazol-2-thionu (**b**).

Schéma syntézy reaktantu a:



Postup prípravy reaktantu a:

Aminoacetaldehyd dimethylacetal (5,0 g; 47,56 mmol) bol pomaly pridaný za stáleho miešania pod dusíkom do prostredia kyseliny chlorovodíkovej 36% (1,1 eq.; 4,49 ml). Následne bol pridaný thiokyanát draselný (4,61 g; 47,56 mmol). Reakčná zmes bola zahrievaná na 85 °C a miešaná po dobu 2 hodín a následne sa nechala schlaďiť na izbovú teplotu. Hneď potom bola schladená v chladničke pri 5 stupňoch, prefiltrovaná za zníženého tlaku a produkt bol nakoniec vysušený v exikátore. Predtým, než bol reaktant **a** použitý pre syntézu výsledného produktu, bol premytý diethyletherom (2 × 5 ml).

1H-imidazol-2-thiol (a)

Vzhľad: bielo-hnedá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 100,01 g/mol

Teoretický výťažok: 4,767 g

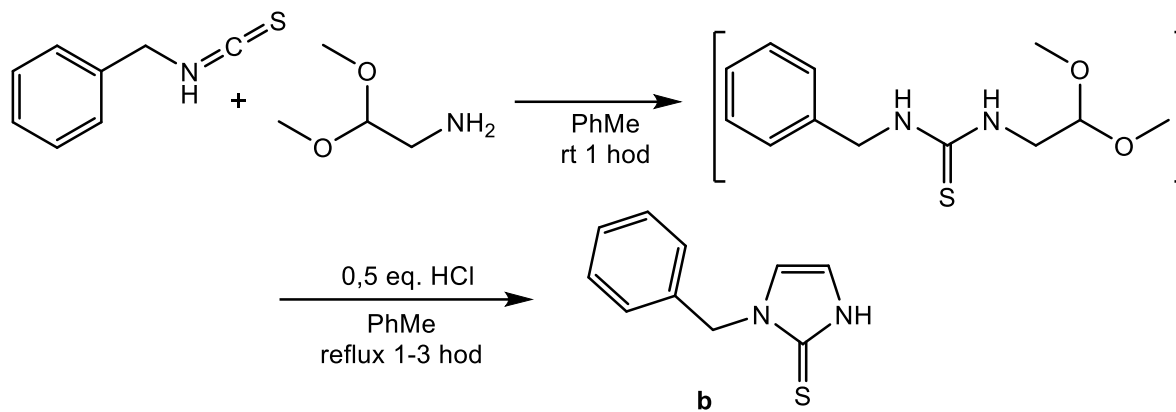
Praktický výťažok: 1,511 g (**32%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.90 (s, 2H), 6.80 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.73, 115.70

Teplota topenia: 207-210 °C (lit. 223-235 °C)³⁰

Schéma syntézy reaktantu **b**:



Postup prípravy reaktantu **b**:

Pri syntéze 1-benzimidazolu-2-thionu bolo spočiatku postupované rovnako ako v prípade reaktantu **a**. Vzhľadom na neuspokojivé výsledky (viac vid' kapitola Výsledky a diskusia) bol aplikovaný nasledujúci pozmenený postup.

K aminoacetaldehydu dimethylacetalu (2 g; 19,02 mmol) v prostredí toluénu (15 ml) bol postupne pridaný benzylisothiokyanát (2,83 g; 19,02 mmol). Reakcia prebiehala pri izbovej teplote za stáleho miešania približne 2 hodiny. Po uplynutí tohto času bola pre výsledné zacyklenie do reakcie pridaná 36% kyselina chlorovodíková (0,5eq.; 0,82 ml). Zmes bola zahrievaná pri teplote varu rozpúšťadla po dobu dvoch hodín. Reakcia bola monitorovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie (mob.fáza: hexán:ethyl-acetát:kyselina octová, 30:10:1). Po ukončení reakcie bolo v zmesi prítomných viac produktov, ktoré boli následne oddelené pomocou stĺpcovej chromatografie so stacionárnou fázou silikagelu a s mobilnou fázou hexán:ethyl-acetát v pomere 2:1.

1-benzylimidazol-2-thion (b)

Vzhľad: bielo-žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 190,06 /mol

Teoretický výtťažok: 3,616 g

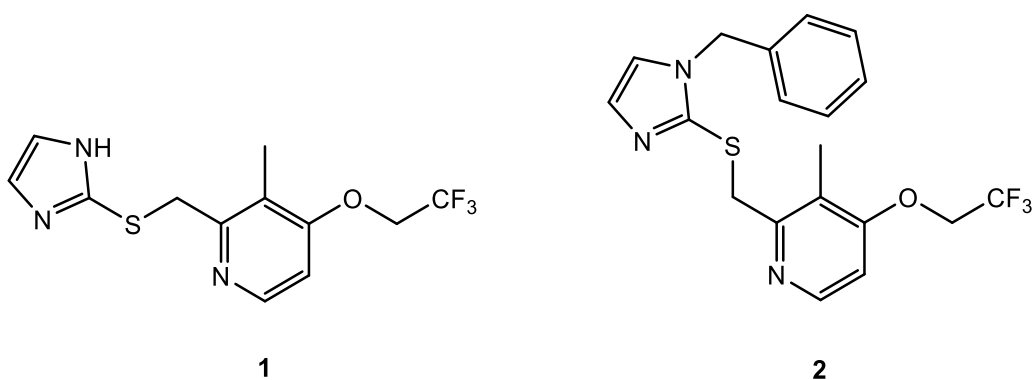
Praktický výtťažok: 0,162 g (4,5%)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 11.83 (s, 1H), 7.37 – 7.27 (m, 5H), 6.70 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.22 (s, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 161.10, 135.82, 129.00, 128.31, 117.82, 114.64, 50.51

Teplota topenia: 143-146 °C (lit. 144-145 °C)³¹

6.2.1.2. Alkylácia finálnych imidazolových analógov LPZS 1 a 2



Obrázok 14 Štruktúra imidazolových analógov 1 a 2

Látky boli pripravené podľa všeobecného postupu uvedeného v kapitole 6.2.:

- Do oboch reakcií bolo použitých 0,100 g alkylačného činidla (0,36 mmol) a 0,084 g triethylamínu (0,83 mmol).
- Pre syntézu produktu 1 bolo použitých 0,047 g reaktantu a (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu 2 bolo použitých 0,090 g reaktantu b (0,47 mmol).
- Reakcie v oboch prípadoch prebiehali po dobu 24 hodín.
- Po ukončení reakcie, produkt 1 bol spracovaný podľa všeobecného postupu 6.2.
- Pre izoláciu produktu 2 sme využili extrakčnú metódu za použitia chloroformu ako organickej fázy (40-50 ml) a roztoku kyseliny chlorovodíkovej ako vodnej fázy (3 × 20 ml). Následne k vodnej fáze bol pridaný roztok NaHCO_3 do pH 7-8 a nakoniec znova extrahovaný s ethyl-acetátom (3 × 20 ml). Ethyl-acetátová fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným a zakoncentrovaná na vákuovej odparke.

2-[(1H-imidazol-2-yl)thiomethyl]-3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridín (1)

Vzhľad: bielo-hnedá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 303,30 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,110 g

Praktický výtťažok: 0,076 g (**69%**)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,25 (s, 1H), 8,22 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,00 (t, *J* = 5,3 Hz, 3H), 4,84 (q, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4,32 (s, 2H), 2,06 (s, 3H)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,67, 156,88, 148,29, 138,83, 124,35 (q, *J* = 277,8 Hz), 120,40, 115,99, 107,19, 65,16 (q, *J* = 34,7 Hz), 38,96, 10,57

MS (ESI) vypočítané: m/z 304,0726 (M+H⁺,100%), 305,0760 (13%)

nájdené: m/z 304,0737 (M+H⁺,100%), 305,0761 (13%)

Teplota topenia: 151-154 °C

2-[(1-benzyl-2,3-dihydro-1H-imidazol-2-yl)thiomethyl]-3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridín (2)

Vzhľad: hnedá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 395,44 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,143 g

Praktický výtťažok: 0,055 g (**38%**)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,23 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,32 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 7,30 – 7,26 (m, 2H), 7,25 – 7,21 (m, 1H), 7,09 – 7,05 (m, 2H), 7,02 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H), 5,03 (s, 2H), 4,85 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,30 (s, 2H), 2,02 (s, 3H)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,75, 156,41, 148,30, 140,26, 137,62, 129,55, 129,19, 128,19, 127,63, 125,25, 124,33 (q, *J* = 277,5 Hz), 120,53, 107,33, 65,18 (d, *J* = 34,5 Hz), 49,71, 39,33, 10,53

MS (ESI) vypočítané: m/z 394,1196 (M+H⁺,100%), 395.1229 (20,5%)

nájdené: m/z 394,1201 (M+H⁺,100%)

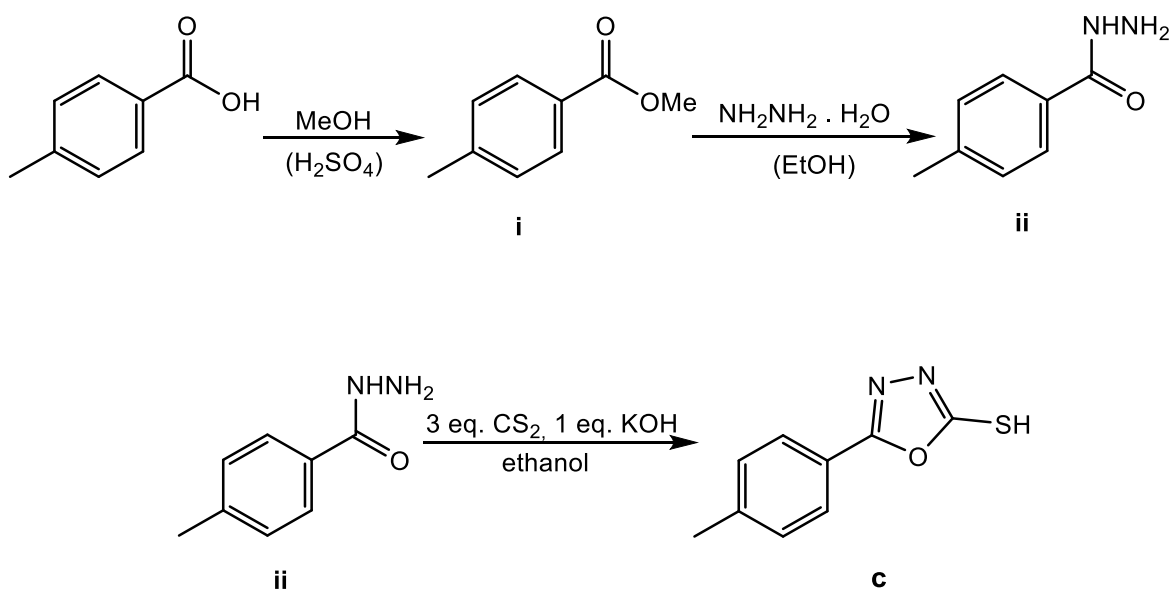
Teplota topenia: 67-70 °C

6.2.2. Syntéza oxadiazolových analógov LPZS (séria II)

6.2.2.1. Príprava reaktantu

Príprave produktu 4 predchádzala príprava jeho reaktantu c. Ostatné vstupné 1,3,4-oxadiazol-2-thioly boli pripravené na katedre v predchádzajúcich rokoch a pred použitím do reakcie neboli žiadnym spôsobom purifikované.

Schéma syntézy reaktantu c:



Postup syntézy reaktantu c:

Prvým krokom bola esterifikácia 16,64 g kyseliny 4-methylbenzoovej (0,12 mol) za pomoci methanolu (300 ml) a kyseliny sírovej 96% (0,2 ml), ktorá v reakcii pôsobila ako katalyzátor. Reakcia prebiehala za varu po dobu 48 hodín a po ukončení reakcie bolo odparené rozpúšťadlo a odparok rozpustený v ethyl-acetáte (50 ml). Následná izolácia methylesteru kyseliny 4-methylbenzoovej (i) prebiehala vyextrahovaním ethyl-acetátvej fázy s NaHCO₃ (3 × 60 ml), jej oddelením, vysušením s bezvodým síranom sodným a následným odparením rozpúšťadla.

V druhom kroku bol takto pripravený ester (i) prevedený na hydrazid (ii). Do reakčnej zmesi esteru (17,00 g, 0,11 mol) s ethanolom (150 ml) bol po kvapkách pridávaný 80% roztok hydrazin-hydrátu (5 eq., 28,33 g, 27,51 ml) a reakcia bola zahrievaná pri teplote varu rozpúšťadla po dobu 24 hodín. Po uplynutí tejto doby bola reakcia schladená a pridané malé množstvo vody za vzniku zrazeniny, ktorá bola prefiltrovaná a premytá vodou a ethanolom. Vzniknutý hydrazid (ii) bol následne použitý pre vznik reaktantu c ale i reaktantu d, ktorý bol použitý pre vznik produktu v ďalšej sérii uvedenej v kapitole 6.2.4.1.

V ďalšom kroku sírouhlík (3,04 g, 2,40 ml, 39,96 mmol) bol pomaly pridaný k zmesi hydrazidu (ii) (2,00 g, 13,32 mmol) a hydroxidu draselného 85% (0,88 g, 13,32 mmol) v ethanole (60 ml). Reakcia bola zahrievaná za varu rozpúšťadla po dobu 14,5 hodín. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené vo vákuovej odparke a zvyšok rozpustený vo vode (20 ml), okyselený kyselinou chlorovodíkovou do pH 2. Nakoniec bol produkt prefiltrovaný a premytý vodou pre dosiahnutie neutrálneho pH a vysušený. Do ďalšej reakcie bol použitý bez ďalšej purifikácie.

methylester kyseliny 4-methylbenzoovej (i)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 150,18 g/mol

Teoretický výtťažok: 18,352 g

Praktický výtťažok: 17,00 g (93%)

4-methylbenzohydrazid (ii)

Vzhľad: žlto-oranžová kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 150,16 g/mol

Teoretický výtťažok: 16,998 g

Praktický výtťažok: 5,112 g (30%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ 9,67 (s, 1H), 7,72 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 4,45 (s, 2H), 2,33 (s, 3H)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 166,05, 141,05, 130,69, 129,00, 127,12, 21,11

Teplota topenia: 109-112 °C (lit. 116-117 °C)³²

5-(*p*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (**c**)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 192,24 g/mol

Teoretický výťažok: 2,561 g

Praktický výťažok: 2,343 g (**91%**)

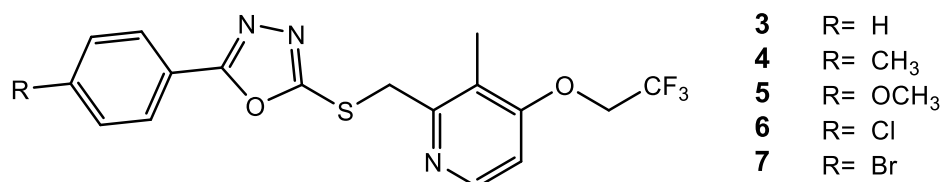
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,68 (s, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 2,38 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177,48, 160,80, 142,71, 130,15, 126,19, 119,89, 21,35

Elementárna analýza: vypočítané: C, 56,23; H, 4,19; N, 14,57; S, 16,68
nájdené: C, 55,88; H, 4,01; N, 14,30; S, 20,75

Teplota topenia: 208-211 °C (lit. 212-214)³²

6.2.2.2. Alkylácia finálnych oxadiazolových analógov LPZS



Obrázok 15 Všeobecná štruktúra oxadiazolových analógov **3-7**

Látky boli pripravené podľa všeobecného postupu uvedeného v kapitole 6.2.:

- Do každej z reakcií bolo použitých 0,100 g alkylačného činidla (0,36 mmol) a 0,084 g triethylamínu (0,83 mmol).
- Pre syntézu produktu **3** bolo použitých 0,084 g 5-fenyl-1,3,4-oxadiazol-2-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **4** bolo použitých 0,091 g 5-(*p*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiolu = reaktant **c** (0,47 mmol).

- Pre syntézu produktu **5** bolo použitých 0,098 g 5-(4-methoxyfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **6** bolo použitých 0,100 g 5-(4-chlorfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **7** bolo použitých 0,121 g 5-(4-bromfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thiolu (0,47 mmol).
- Reakčná doba alkylácie u produktov **3**, **4**, **5**, **7** prebiehala po dobu 12 hodín a u produktu **6** po dobu 36 hodín.
- Izolácia všetkých produktov prebiehala na základe extrakcie podľa všeobecného postupu 6.2. bez nutnosti využiť ďalšiu oddeľovaciu metódu.

2-[[3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methylthio]-5-fenyl-1,3,4-oxadiazol (3)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 381,37 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,138 g

Praktický výtťažok: 0,105 g (**76%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,30 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,00 – 7,94 (m, 2H), 7,66 – 7,55 (m, 3H), 7,11 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,91 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,78 (s, 2H), 2,24 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165,31, 164,05, 161,30, 154,27, 147,87, 132,16, 129,59, 126,56, 123,95 (d, *J* = 277,5 Hz), 123,25, 119,97, 107,29, 64,86 (q, *J* = 34,6 Hz), 37,29, 10,30

MS (ESI) vypočítané: m/z 382,0832 (M+H⁺,100%), 383,0865 (18,4%)

m/z 404,0651 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 382,0840 (M+H⁺,100%), 383,0865 (18,4%)

m/z 404,0658 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 164-167 °C

2-[[3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl]methylthio]-5-(p-tolyl)-1,3,4-oxadiazol (4)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 395,40 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,143 g

Praktický výtťažok: 0,084 g (59%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,29 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H), 7,40 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,91 (q, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,77 (s, 2H), 2,39 (s, 3H), 2,23 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,42, 163,63, 161,30, 154,32, 147,87, 142,34, 130,14, 126,53, 123,96 (d, $J = 277,6$ Hz), 120,51, 119,97, 107,28, 64,85 (d, $J = 34,8$ Hz), 37,28, 21,29, 10,30

MS (ESI) vypočítané: m/z 396,0988 (M+H⁺,100%), 397,1022 (19,5%)

m/z 418,0808 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 396,0997 (M+H⁺,100%), 397,1024 (19,5%)

m/z 418,0810 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 172-175 °C

2-(4-methoxyfenyl)-5-{[3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin-2-yl]methylthio}-1,3,4-oxadiazol (5)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 411,40 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,149 g

Praktický výtťažok: 0,081 g (54%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,29 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,15 – 7,08 (m, 3H), 4,91 (q, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,75 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,23 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 165,28, 163,16, 162,21, 161,30, 154,37, 147,87, 128,43, 123,96 (d, $J = 277,8$ Hz), 119,97, 115,60, 115,03, 107,27, 64,86 (q, $J = 34,7$ Hz), 55,69, 37,29, 10,29

MS (ESI) vypočítané: m/z 412,037 (M+H⁺,100%), 413,0971 (19,5%)

m/z 434,0757 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 412,0940 (M+H⁺,100%), 413,0966 (19,5%)

m/z 434,0761 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 168-171 °C

2-(4-chlorfenyl)-5-{{3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl}methylthio}-1,3,4-oxadiazol (6)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 415,82 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,151 g

Praktický výtťažok: 0,123 g (**81%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,30 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,98 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,67 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,11 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,91 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,79 (s, 2H), 2,23 (s, 3H)

MS (ESI) vypočítané: m/z 416,0442 (M+H⁺,100%), 418,0412 (32%)

nájdené: m/z 416,0456 (M+H⁺,100%), 418,0426 (32%)

Teplota topenia: 185-188 °C

2-(4-bromfenyl)-5-{{3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin-2-yl}methylthio}-1,3,4-oxadiazol (7)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 460,27 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,167 g

Praktický výtťažok: 0,115 g (**69%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,30 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,11 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,91 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,79 (s, 2H), 2,23 (s, 3H)

MS (ESI) vypočítané: m/z 459,9937 (M+H⁺,100%), 461,9916 (97,3%)

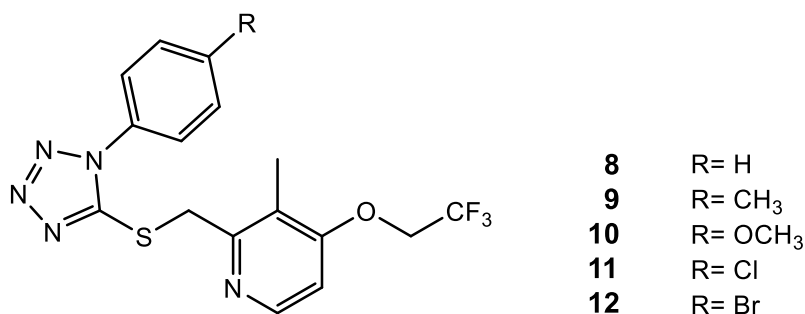
nájdené: m/z 459,9941 (M+H⁺,100%), 461,9923 (97,3%)

Teplota topenia: 182-185 °C

6.2.3. Syntéza 1-*H*-tetrazolových analógov LPZS (séria III)

Všetky vstupné tetrazoly boli pripravené na katedre v predchádzajúcich rokoch a pred použitím do alkylačných reakcií neboli žiadnym spôsobom čistené.

6.2.3.1. Alkylácia finálnych 1-*H*-tetrazolových analógov LPZS



Obrázok 16 Všeobecná štruktúra analógov LPZS **8-12**

Látky boli pripravené podľa všeobecného postupu uvedeného v kapitole 6.2.:

- Do všetkých reakcií bolo použitých 0,100 g alkylačného činidla (0,36 mmol) a 0,084 g triethylamínu (0,83 mmol).
- Pre syntézu produktu **8** bolo použitých 0,084 g 1-fenyl-1-*H*-tetrazol-5-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **9** bolo použitých 0,091 g 1-(*p*-tolyl)-1-*H*-tetrazol-5-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **10** bolo použitých 0,098 g 1-(4-methoxyfenyl)-1-*H*-tetrazol-5-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **11** bolo použitých 0,100 g 1-(4-chlorfenyl)-1-*H*-tetrazol-5-thiolu (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **12** bolo použitých 0,121 g 1-(4-bromfenyl)-1-*H*-tetrazol-5-thiolu (0,47 mmol).
- Reakčná doba všetkých produktov **8-12** prebiehala 12-24 hodín.
- Izolácia produktov **8-11** prebiehala podľa všeobecného postupu 6.2.,

- Izolácia produktu **12** zahŕňala najskôr samotnú extrakciu podľa všeobecného postupu 6.2. a filtráciu zrazeniny z organickej fázy extrakcie.

3-methyl-2-[(1-fenyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl]-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin (8)

Vzhľad: bielo-žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 381,38 g/mol

Teoretický výťažok: 0,138 g

Praktický výťažok: 0,090 g (**65%**)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,24 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,37 – 7,27 (m, 3H), 7,24 – 7,19 (m, 2H), 7,06 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,87 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,71 (s, 2H), 2,14 (s, 3H)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,62, 154,55, 154,36, 148,17, 134,58, 129,44, 128,98, 128,38, 124,32 (q, *J* = 278,1 Hz), 120,29, 107,64, 65,22 (d, *J* = 34,7 Hz), 38,57, 10,58

Teplota topenia: 124-127 °C

*3-methyl-2-[[1-(*p*-tolyl)-1H-tetrazol-5-yl]thiomethyl]-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin (9)*

Vzhľad: bielo-žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 395,40 g/mol

Teoretický výťažok: 0,143 g

Praktický výťažok: 0,112 g (**78%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,25 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,45 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,09 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,90 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,78 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 2,19 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,24, 154,43, 154,01, 147,75, 140,75, 130,85, 130,51, 124,62, 123,95 (d, *J* = 277,5 Hz), 119,92, 107,27, 64,85 (q, *J* = 34,7 Hz), 38,24, 20,94, 10,23

MS (ESI) vypočítané: m/z 396,1100 (M+H⁺,100%), 397,1134 (18,4%)

nájdene: m/z 396,1110 (M+H⁺,100%), 397,1138 (18,4%)

Teplota topenia: 176-179 °C

2-{{[1-(4-methoxyfenyl)-1H-tetrazol-5-yl]thiomethyl}-3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin
(10)

Vzhľad: bielo-žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 411,40 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,149 g

Praktický výtťažok: 0,083 g (**56%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,26 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,18 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,09 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 4,90 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,77 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 2,19 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,26, 160,75, 154,59, 154,01, 147,72, 126,54, 125,94, 123,95 (q, *J* = 278,0 Hz), 119,91, 115,18, 107,28, 64,85 (q, *J* = 34,5 Hz), 55,86, 38,18, 10,23

MS (ESI) vypočítané: m/z 412,1050 (M+H⁺,100%), 413,1083 (18,4%)

m/z 434,0869 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 412,1058 (M+H⁺,100%)

m/z 434,0872 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 180-183 °C

2-{{[1-(4-chlorfenyl)-1H-tetrazol-5-yl]thiomethyl}-3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin
(11)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 415,82 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,151 g

Praktický výtťažok: 0,131 g (**87%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,25 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,77 – 7,66 (m, 4H), 7,09 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,90 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,77 (s, 2H), 2,19 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,25, 154,50, 153,91, 147,73, 135,35, 132,15, 130,16, 126,65, 123,94 (q, *J* = 278,0 Hz), 119,92, 107,29, 64,85 (q, *J* = 34,6 Hz), 38,46, 10,21

MS (ESI) vypočítané: m/z 416,0554 (M+H⁺,100%), 418,0525 (32%)

m/z 438,0374 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 416,0564 (M+H⁺,100%), 418,0538 (32%)
m/z 438,0378 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 176-179 °C

2-[[1-(4-bromfenyl)-1H-tetrazol-5-yl]thiomethyl]-3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin
(12)

Vzhľad: bielo-žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 460,27 g/mol

Teoretický výt'azok: 0,167 g

Praktický výt'azok: 0,044 g (**26%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,25 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,64 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,09 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,90 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,78 (s, 2H), 2,19 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,25, 154,52, 153,94, 147,78, 133,16, 132,60, 126,86, 123,98 (d, *J* = 278,0 Hz), 123,94, 119,92, 107,31, 64,86 (q, *J* = 34,5 Hz), 38,51, 10,25

MS (ESI) vypočítané: m/z 460,0049 (M+H⁺,100%), 462,0029 (97,3%), 461,0083 (17,3%),
463,0062 (16,8%)

m/z 481,9869 (M+ Na⁺,100%)

nájdené: m/z 460,0057 (M+H⁺,100%), 462,0037 (97,3%), 463,0061 (17,3%),
464,0018 (16,8%)

m/z 481,9871 (M+ Na⁺,100%)

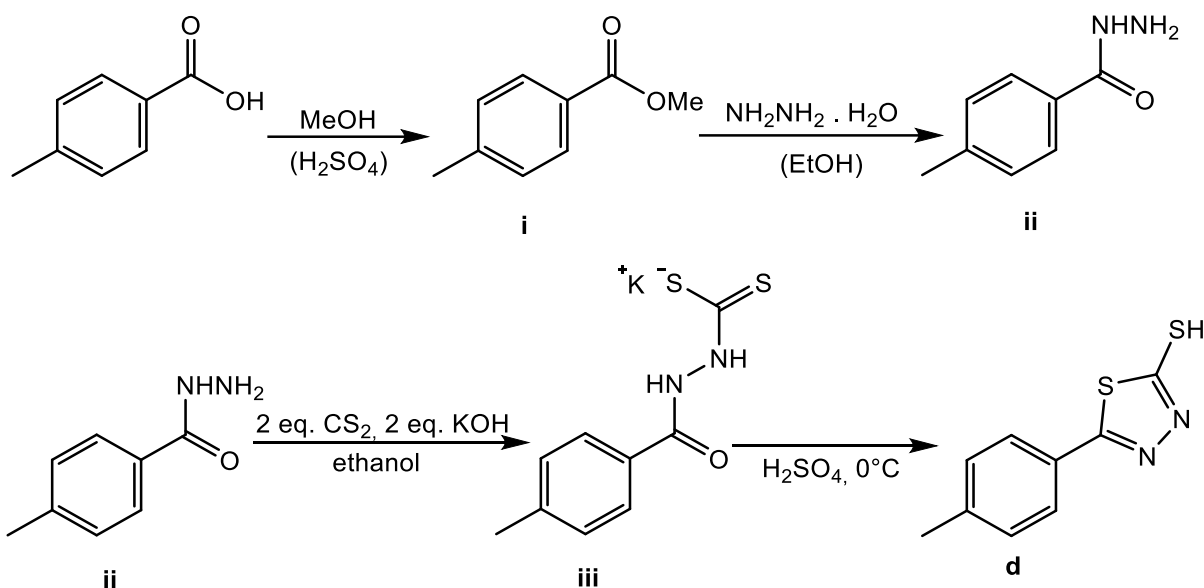
Teplota topenia: 206-209 °C

6.2.4. Syntéza thiadiazolových analógov (séria IV)

6.2.4.1. Príprava reaktantu

V rámci tejto série bol pripravený vstupný reaktant **d**, ktorý bol použitý pre syntézu produktu **13**. Príprava sa skladá z viacerých krokov a vychádza z počiatočnej štruktúry substituovanej kyseliny benzoovej.

Schéma syntézy reaktantu **d**:



Postup syntézy reaktantu **d**:

Prvé dva kroky syntézy až do vzniku hydrazidu (**ii**) sú opísané v kapitole 6.2.2.1. Následné kroky syntézy pokračujú odlišným spôsobom, než tomu bolo v prípade 1,3,4-oxadiazol-2-thiolu.

V treťom kroku bol sírouhlík (2,03 g, 1,6 ml, 26,64 mmol) pomaly po kvapkách pridaný do roztoku hydrazidu (**ii**) a hydroxidu draselného (1,76 g, 26,64 mmol) v ethanole (60 ml). Reakcia prebiehala pri izbovej teplote po dobu 16 hodín. Po ukončení reakcie bol do reakcie pridaný diethylether (30 ml). Vzniknutý dithiokarbamát (**iii**) bol prefiltrovaný, premytý etherom a použitý v štvrtom kroku pre vznik samotnej látky **d**.

0,5 g dithiokarbamátu **iii** (1,89 mmol) bolo pridaných v malých množstvách do koncentrovanej kyseliny sírovej (4 ml) pri 0°C za intenzívneho miešania po dobu 4 hodín a následne bola celá reakčná zmes vyliata na ľad. Zrazenina bola prefiltrovaná a rozpustená vo vodnom roztoku hydroxidu sodného a následne znova prefiltrovaná, čím sme sa zbavili prítomných nečistôt a filtrát bol znova okyselený vodným roztokom kyseliny chlorovodíkovej a vzniknutá zrazenina thiadiazolu (**d**) znova prefiltrovaná a premytá vodou.

2-(4-methylbenzoyl)hydrazin-1-dithiokarbamát draselný (**iii**)

Molárna hmotnosť: 264,40 g/mol
Teoretický výťažok: 3,51 g
Praktický výťažok: 2,90 g (**83%**)
Celý výťažok bol použitý do nasledujúcej reakcie

5-(p-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-thiol (d)

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 208,30

Teoretický výťažok: 0,394 g

Praktický výťažok: 0,149 g (**38%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,67 (s, 1H), 7,62 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 7,33 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H), 2,35 (s, 3H)

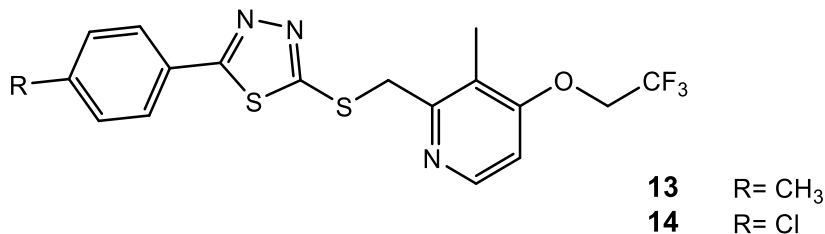
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 187,93, 160,68, 142,22, 130,43, 126,95, 126,39, 21,49

Elementárna analýza: vypočítané: C, 51,9; H, 3,87; N, 13,45; S, 30,78
nájdené: C, 51,5; H, 3,58; N, 13,27; S, 34,58

Teplota topenia: 196-199 °C (lit. 196-200 °C)³²

Reaktant 5-(4-chlorfenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-thiol pre prípravu produktu **14** bol pred použitím prečistený rozpustením v 20 ml 1M roztoku hydroxidu sodného, nerozpustené nečistoty odfiltrované cez fritu a filtrát opäť okyselený malým množstvom (3-5 ml) kyseliny chlorovodíkovej, čím reaktant opäť vykryštalizoval. Následne bola čistota látky kontrolovaná pomocou TLC, čím bolo zistené, že nečistotu sa z reaktantu nepodarilo eliminovať.

6.2.4.2. Alkylácia finálnych thiadiazolových analógov LPZS



Obrázok 17 Všeobecná štruktúra analógov LPZS **13** a **14**

Látky boli pripravené podľa všeobecného postupu uvedeného v kapitole 6.2.:

- Do oboch reakcií bolo použitých 0,100 g alkylačného činidla (0,36 mmol) a 0,084 g triethylamínu (0,83 mmol).
- Pre syntézu produktu **13** bolo použitých 0,098 g 5-(*p*-tolyl)-1,3,4-thiadiazol-2-thiolu (reaktant **d**) (0,47 mmol).
- Pre syntézu produktu **14** bolo použitých 0,108 g 5-(4-chlorofenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-thiolu
- Reakčná doba oboch reakcií trvala približne 24 hodín.
- Izolácia produktu **13** prebiehala podľa všeobecného postupu 6.2.
- Produkt **14** po NMR analýze nebol čistý, preto bol izolovaný pomocou stĺpcovej chromatografie za využitia silikagelu ako stacionárnej fázy a mobilnej fázy hexán:ethyl-acetát v pomere 3:1.

*2-{{3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-2-yl}methylthio}-5-(p-tolyl)-1,3,4-thiadiazol (**13**)*

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 411,46 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,149 g

Praktický výtťažok: 0,058 g (**39%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,34 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,34 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,14 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 4,93 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,79 (s, 2H), 2,36 (s, 3H), 2,24 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168,64, 165,12, 161,99, 154,61, 147,80, 141,90, 130,48, 127,85, 127,06, 124,22 (d, $J = 277,6$ Hz), 120,74, 107,72, 65,21 (q, $J = 34,6$ Hz), 38,73, 21,46, 10,70

MS (ESI) vypočítané: m/z 412,0760 (M+H⁺,100%), 413,0793 (19,5%)
m/z 434,0579 (M+ Na⁺,100%)
nájdené: m/z 412,0763 (M+H⁺,100%), 413,0786 (19,5%)
m/z 434,0577 (M+ Na⁺,100%)

Teplota topenia: 140-143 °C

2-(4-chlorfenyl)-5-{{[3-methyl-4-(2,2,2-trifluorethoxy)pyridin-2-yl]methylthio}-1,3,4-thiadiazol (14)

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 431,88 g/mol

Teoretický výt'azok: 0,156g

Praktický výt'azok: 0,042 g (27%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8,31 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 7,92 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H), 4,91 (q, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,79 (s, 2H), 2,24 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 166,94, 166,14, 161,33, 154,52, 147,89, 136,08, 129,70, 129,29, 128,32, 123,95 (q, $J = 277,5$ Hz), 120,11, 107,29, 64,85 (q, $J = 34,4$ Hz), 38,83, 10,36

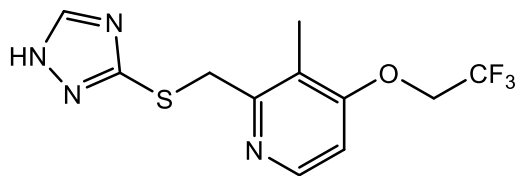
MS (ESI) vypočítané: m/z 432,0213 (M+H⁺,100%), 434,0184 (32%)
nájdené: m/z 432,0225 (M+H⁺,100%), 434,0197 (42%)

Teplota topenia: 129-131 °C

6.2.5. Syntéza triazolového analógu (séria V)

Vstupný 1H-1,2,4-triazol-3-thiol bol pripravený na katedre v minulých rokoch a pred použitím do alkylačnej reakcie nebol žiadnym spôsobom čistený.

6.2.5.1. Alkylácia finálneho triazolového analógu



15

Obrázok 18 Štruktúra triazolového analógu **15**

Látka bola pripravená podľa všeobecného postupu uvedeného v kapitole 6.2.:

- Do reakcie bolo použitých 0,100 g alkylačného činidla (0,36 mmol) a 0,084 g triethylamínu (0,83 mmol).
- Pre syntézu produktu **15** bolo použitých 0,048 g 1*H*-1,2,4-triazol-3-thiolu (0,47 mmol).
- Reakčná doba bola 24 hodín.
- Izolácia produktu **15** prebiehala podľa všeobecného postupu 6.2.

2-[(1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)thiomethyl]-3-methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin (**15**)

Vzhľad: bielo-hnedá kryštalická látka

Molekulová hmotnosť: 304,29 g/mol

Teoretický výtťažok: 0,110 g

Praktický výtťažok: 0,078 g (**71%**)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,57 (s, 1H), 8,28 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,88 (q, *J* = 8,7 Hz, 2H), 4,50 (s, 2H), 2,19 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161,28, 158,92, 156,19, 147,95, 144,90, 123,98 (q, *J* = 277,5 Hz), 120,04, 106,96, 64,81 (q, *J* = 34,6 Hz), 36,42, 10,36

MS (ESI) vypočítané: *m/z* 305,0678 (M+H⁺,100%), 306,0712 (11,9%)

nájdene: *m/z* 305,0693 (M+H⁺,100%), 306,0714 (11,9%)

Teplota topenia: 106-109 °C

7. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Inšpiráciou pre túto prácu sa stal objav, ktorý v rámci screeningu „starých“ molekúl naznačil súvislosť medzi rokmi používaným lansoprazolom a jeho „novým“ antituberkulotickým účinkom. Nakoľko žiadna substitúcia na benzimidazolovej časti nevykazovala spomínaný účinok, v tejto práci sme sa zamerali práve na jeho obmenu za heterocyklické štruktúry, ktoré už majú v terapii tuberkulózy svoje opodstatnenie.

Mechanizmom reakcie je jednoduchá alkylácia heterocyklických thiolov za použitia alkylačného činidla – substituovaného pyridínium chloridu s použitím triethylamínu na vyviazanie protónov, v ekvivalentnom množstve, ktoré odpovedá súčtu látkových množstiev oboch reaktantov (heterocyklického thiolu a alkylačného činidla). Bolo tak pripravených celkom 5 sérií obmien s jednotlivými substitúciami v každej sérii.

Séria I je založená na zámene benzimidazolovej časti za vzniku imidazolového analógu, ktorý je lansoprazol sulfidu štruktúrne najbližší. Taktiež v rámci tejto série bol pripravený aj benzylom substituovaný imidazolový analóg.

Séria II využíva k vzniku nových analógov 1,3,4-oxadiazol-2-thiol a jeho substituované varianty. Tento heterocyklus zohráva význam vo viacerých terapeutických odvetviach vrátane terapie TBC. Niektoré štúdie vrátane výskumu na našej katedre³² uvádzajú, že má veľký potenciál antituberkulózneho účinku, pretože môže zaujímať funkciu bioizosterickej náhrady hydrazidovej skupiny v liečivách prvej voľby TBC, ale tiež pôsobiť na nové cieľové štruktúry³³.

Tetrazoly používané v sérii III našli taktiež svoje uplatnenie v syntéze rady liečiv ako napríklad antibiotík, antileukotrieník, nesteroidných antiflogistík a tak bolo stavené na ich chemické vlastnosti aj v terapii TBC. Rovnako ako štruktúry na bázy tetrazolov, pripravené katedrou v minulých rokoch, medzi ktoré mimo iné patril aj bis(4-chlorfenyltetrazol-5-yl)disulfid, ktorého aktivita u niektorých kmeňov prevýšila komerčne užívané antituberkulotiká.³⁴

V jednej zo štúdií sa ukázalo, že látky, ktoré obsahovali vo svojej štruktúre thiadiazolový heterocyklus mali silnú aktivitu in vivo na myších modeloch infikovaných tuberkulózou.³⁵ Na základe tejto šablóny boli pripravené v sérii IV thiadiazolové analógy lansoprazol sulfidu substituované *p*-tolylom a chlorfenylom.

A nakoniec séria V, ktorá obsahovala len jeden analóg a to konkrétne 1,2,4-triazolový analóg.

7.1. Syntéza imidazolových analógov LPZS (séria I)

V tejto sérii boli najskôr pripravené samotné imidazolové reaktanty (**a** a **b**). Za povšimnutie stojí veľmi nízky výťažok látky **b**, ktorý bol najskôr pripravený rovnakým postupom ako v prípade látky **a**. Výťažok tak činil 9%, čo je v porovnaní s látkou **a** o viac než 20% menej (výťažok látky **a** činí 32%). K nízkemu výťažku prispela aj skutočnosť, že po oddelení výslednej látky **b** pomocou stĺpcovej chromatografie bol ako druhá zložka reakčnej zmesi, pomocou NMR, identifikovaný nezacyklený medziprodukt. Tento medziprodukt zastupoval značnú časť vo výslednej reakčnej zmesi (2,513 g; 70% teoretického výťažku). Vzhľadom na popisované sme sa rozhodli pre syntézu 1-benzylimidazol-2-thionu iným postupom.

V tomto postupe bola upravená Marckwaldova metóda syntézy 1-substituovaného imidazol-2-thionu, kedy v prvom kroku pre vznik thiomocovinového medziproduktu reakcia prebieha pri izbovej teplote v prostredí toluénu a konečné zacyklenie prebieha po pridaní koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej za teploty varu toluénu. Pôvodná Marckwaldova metóda je založená na izolovaní vzniknutého thiomocovinového medziproduktu. Zacyklenie prebieha až po izolácii medziproduktu.³⁶ V tomto prípade taktiež nebol dosiahnutý uspokojivý výťažok – 4,5%. Výsledné množstvo látky **b** však stačilo pre ďalšiu alkyláciu, analýzu a testovanie, preto neboli aplikované už žiadne ďalšie postupy pre dosiahnutie lepšieho výťažku. Jedinou snahou o zvýšenie výťažnosti reakcie bolo aplikovanie rovnakého postupu ako vo vyššie spomínanom prípade s rozdielom zvýšenia množstva kyseliny chlorovodíkovej z 0,5 ekvivalentu na 3 ekvivalenty, avšak výsledkom bola olejovitá látka s obsahom rôznych prímiesí.

Aj výťažky výsledného produktu **2** (38%) boli v porovnaní so 69% výťažkom produktu **1** výrazne nižšie. Môže to však súvisieť s náročnejšou izoláciou a vyššou stratou produktu než v prípade látky **1**, kedy len samotná extrakcia s ethyl-acetátom a vodným roztokom NaHCO₃ nedokázala izolovať výsledný produkt **2**. Taktiež sa to nepodarilo ani v prípade prevedenia stĺpcovej chromatografie s mobilnou fázou chloroform:methanol

v pomere 15:1. Nakoniec sme sa pokúsili produkt vyextrahovať s organickou fázou chloroformu a slabým roztokom kyseliny chlorovodíkovej (2-3%), čím sme zabezpečili vznik soli a extrakciu nečistôt do organickej fázy. Po pridaní NaHCO₃ bol produkt vytesnený zo soli a následne tak mohol byť extrahovaný ako neionizovaný podľa štandardného postupu s organickou fázou ethyl-acetátu.

7.2. Syntéza oxadiazolových, 1*H*-tetrazolových a triazolových analógov LPZS (séria II, III a V)

Séria II je koncipovaná na príprave analógov LPZS za využitia substituovaných 1,3,4-oxadiazol-2-thiolov. Reakcie a následná izolácia produktov prebiehala bez významnejších komplikácií a vždy s výtťažkom vyšším než 50% a ich čistota a identita bola overená pomocou TLC a NMR spektroskopie pričom u produktu **6** a **7** sa nám nepodarilo zmerať ¹³C NMR, kvôli nízkej rozpustnosti v DMSO.

Pri izolácii produktu **12** zo série III bola počas extrakcie v organickej fáze prítomná zrazenina, ktorá bola odfiltrovaná a analyzovaná pomocou NMR, ktoré ukázalo, že produkt sa nachádzal aj v zrazenine na filtri a rovnako tak aj vo filtráte.

Séria V zahŕňa len jednu alkyláciu 1*H*-1,2,4-triazol-3-thiolu, kde priebeh reakcie aj izolácia produktu prebiehali štandardne podľa obecného postupu a v porovnaní s ostatnými produktami vykazoval aj veľmi dobrý výtťažok (71%).

7.3. Syntéza thiadiazolových analógov LPZS (séria IV)

Séria IV založená na thiadiazolovej obmene obnášala v prípade produktu **14** viacero komplikácií a to najskôr nečistota vstupného 5-(4-chlorfenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-thiolu, ktorý sa nepodarilo vyčistiť spomínanou metódou. Táto skutočnosť mohla pravdepodobne viesť k prítomnosti nečistoty aj vo výslednom produkte. Izoláciou pomocou stĺpcovej chromatografie sa nám podarilo izolovať len časť produktu, čo je pravdepodobne dôvodom nízkeho výtťažku, ktorý činí 27%. Ďalšie metódy na izoláciu čistého produktu **14** neboli aplikované.

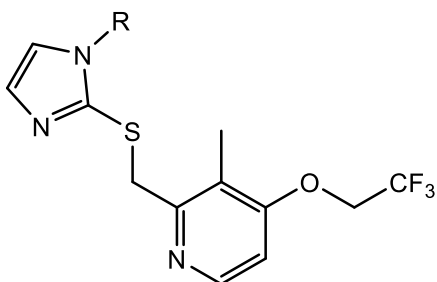
7.4. Výsledky antimykobakteriálnej účinnosti in vitro

U všetkých finálnych látok zo sérií I-V, okrem produktov **12** a **13** bola otestovaná ich antimykobakteriálna aktivita in vitro v špecializovanom pracovisku – Zdravotný ústav so sídlom v Ostrave. V testovaní boli využité kmene: *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*. Nasledujúce tabuľky uvádzajú namerané hodnoty minimálnych inhibičných koncentrácií v $\mu\text{mol/l}$ u každej z látok. Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) je hodnota, ktorá udáva najnižšiu koncentráciu testovanej látky v spomínaných jednotkách, ktorá spôsobuje inhibíciu rastu mykobaktérií. U *M. tuberculosis* a *M. avium* bola zisťovaná po 14 a 21 dňoch a u *M. kansasii* po 7, 14 a 21 dňoch inkubácie. V tabuľke 3 sú pre porovnanie uvedené hodnoty in vitro aktivity u dvoch najúčinnějších liečiv prvej voľby – rifampicinu a isoniazidu – a predlohového LPZS.

Tabuľka 3 Antimykobakteriálna aktivita rifampicinu a isoniazidu a predlohového LPZS (MIC v $\mu\text{mol/l}$)

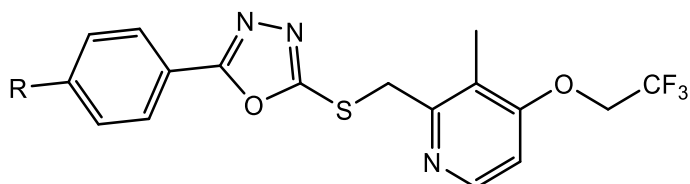
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
Rifampicin	0,25 (14 dní)	31 (14 dní)	0,125 (14 dní)
Isoniazid	0,5/1 (14/21 dní)	>250/>250 (14/21 dní)	4/4/4 (7/14/21 dní)
LPZS	1,13 (7 dní)	>100 (7 dní)	n.d.

Tabuľka 4 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série I (MIC v $\mu\text{mol/l}$)



	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
	14/21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
1 (R=H)	500/500	1000/>1000	500/1000/1000
2 (R= benzyl)	64/125	500/500	64/125/250

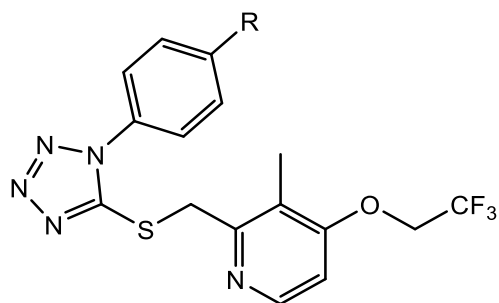
Tabuľka 5 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série II (MIC v $\mu\text{mol/l}$)



	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
	14/21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
3 (R=H)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
4 (R=CH ₃)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
5 (R=OCH ₃)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

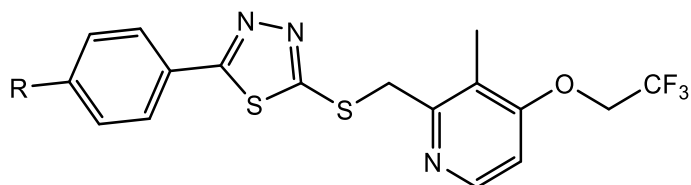
6 (R=Cl)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500
7 (R=Br)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

Tabuľka 6 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série III (MIC v $\mu\text{mol/l}$)



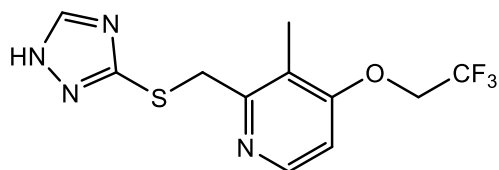
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
	14/21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
8 (R=H)	>1000/>1000	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000
9 (R=CH ₃)	>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
10 (R=OCH ₃)	>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
11 (R=Cl)	>250/>250	>250/>250	>250/>250/>250
12 (R=Br)	nebol hodnotený		

Tabuľka 7 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série IV (MIC v $\mu\text{mol/l}$)



	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
	14/21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
13 (R=CH ₃)	nebol hodnotený		
14 (R=Cl)	>500/>500	>500/>500	>500/>500/>500

Tabuľka 8 Antimykobakteriálna aktivita látky zo série V (MIC v $\mu\text{mol/l}$)



	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
	14/21 dní	14/21 dní	7/14/21 dní
15	>250/>250	>250/>250	>500/>500/>500

Z produktov, u ktorých bola otestovaná antimykobakteriálna aktivita in vitro, ani jeden nevykazoval aktivitu, ktorá by sa blížila hodnotám nameraným u lansoprazol sulfidu. Z uvedených sa odlišuje jedine produkt **2**, u ktorého hodnoty proti *M. tuberculosis* neprevyšujú 250 MIC, ale z hľadiska účinku je i táto aktivita bezvýznamná.

Produkt **12** zo série III nebol do odovzdania práce otestovaný, ale vzhľadom na neúčinnosť podobných štruktúr v tejto sérii je očakávaný rovnaký výsledok aj u tejto látky. Rovnako tak produkt **13** zo série IV.

8. ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo nadviazať na úspešný objav, v ktorom bola zistená antituberkulózná aktivita lansoprazol sulfidu. Princípom tak bolo obmeniť benzimidazolovú časť molekuly lansoprazol sulfidu za účelom vzniku jeho analógov s potenciálnou antituberkulotickou aktivitou.

Bolo pripravených 5 sérii analógov s obmenami za heterocykly, ktoré majú svoje opodstatnenie v iných antituberkuloticky účinných štruktúrach. V sérii I tak bol použitý imidazolový heterocyklus, pričom jeden z dvoch analógov tejto série vykazoval lepšiu aktivitu než všetky ostatné analógy. Avšak táto aktivita nie je dostatočná v porovnaní so samotným lansoprazol sulfidom.

V sérii II bolo pripravených celkom 5 analógov s 1,3,4-oxadiazolovým heterocyklom. Hodnoty účinnosti vyjadrených v MIC sa pohybovali v hodnotách vyšších než 500, čo znamená, že voči testovaným kmeňom nemajú takmer žiadnu účinnosť.

Rovnako tak aj séria III, v ktorej boli využité tetrazolové heterocykly, nejavila žiadne známky účinnosti.

Ukázalo sa, že ani séria IV, ktorá bola stavaná na obmene za thiadiazolové heterocykly, a ani séria V, ktorú tvoril jediný triazolový analóg, nebola úspešná čo sa týka účinnosti.

9. ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV

Obrázok 1 Isoniazid a jeho analóg LL-3858.....	14
Obrázok 2 Rifampicin a jeho analógy	15
Obrázok 3 Ethambutol a jeho analóg SQ-109	16
Obrázok 4 Pyrazinamid a jeho lipofilný ester.....	17
Obrázok 5 Štruktúra moxifloxacinu.....	19
Obrázok 6 Štruktúra linezolidu	19
Obrázok 7 Štruktúra bedaquilinu	20
Obrázok 8 Štruktúra delamanidu	21
Obrázok 9 Štruktúra telacebacu a inhibítora bd - ND-011992	22
Obrázok 10 Štruktúra lansoprazolu	23
Obrázok 11 Intracelulárna redukcia lansoprazolu na lansoprazol sulfid	24
Obrázok 12 Štruktúry omeprazolu, pantoprazolu a 5-hydroxylansoprazolu	25
Obrázok 13 Všeobecná štruktúra analógov lansoprazol sulfidu pripravených a študovaných v tejto práci.....	26
Obrázok 14 Štruktúra imidazolových analógov 1 a 2	31
Obrázok 15 Všeobecná štruktúra oxadiazolových analógov 3-7	35
Obrázok 16 Všeobecná štruktúra analógov LPZS 8-12	39
Obrázok 17 Všeobecná štruktúra analógov LPZS 13 a 14	45
Obrázok 18 Štruktúra triazolového analógu 15	47

10. ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Prehľad symptómov u primárnej TBC a u reaktivovanej TBC	10
Tabuľka 2 Klasifikácia liečiv pre terapiu MDR-TB.....	18
Tabuľka 3 Antimykobakteriálna aktivita rifampicinu a isoniazidu a predlohového LPZS (MIC v $\mu\text{mol/l}$).....	51
Tabuľka 4 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série I (MIC v $\mu\text{mol/l}$)	52
Tabuľka 5 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série II (MIC v $\mu\text{mol/l}$).....	52
Tabuľka 6 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série III (MIC v $\mu\text{mol/l}$).....	53
Tabuľka 7 Antimykobakteriálna aktivita látok zo série IV (MIC v $\mu\text{mol/l}$)	54
Tabuľka 8 Antimykobakteriálna aktivita látky zo série V (MIC v $\mu\text{mol/l}$).....	54

11. ZDROJE

- (1) Bell, L. C. K.; Noursadeghi, M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium Tuberculosis Co-Infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16* (2), 80–90.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.128>.
- (2) Global tuberculosis report 2020 <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131> (cit. Nov 28, 2020).
- (3) Lyon, S. M.; Rossman, M. D. Pulmonary Tuberculosis. *Microbiol. Spectr.* **2017**, *5* (1).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0032-2016>.
- (4) Furin, J.; Cox, H.; Pai, M. Tuberculosis. *Lancet Lond. Engl.* **2019**, *393* (10181), 1642–1656.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30308-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30308-3).
- (5) S, T.; R, B.; Ja, C.; R, C.; Ma, A.; M, S.; J, P.; Gb, M. The challenge of the new tuberculosis drugs <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28256383/> (cit. Nov 29, 2020).
<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.016>.
- (6) Singh, R.; Dwivedi, S. P.; Gaharwar, U. S.; Meena, R.; Rajamani, P.; Prasad, T. Recent Updates on Drug Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128* (6), 1547–1567.
<https://doi.org/10.1111/jam.14478>.
- (7) Khawbung, J. L.; Nath, D.; Chakraborty, S. Drug Resistant Tuberculosis: A Review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *74*, 101574.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101574>.
- (8) Tuberculosis (TB) <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (cit. Nov 29, 2020).
- (9) Maitre, T.; Aubry, A.; Jarlier, V.; Robert, J.; Veziris, N.; Bernard, C.; Sougakoff, W.; Brossier, F.; Cambau, E.; Mougari, F.; Raskine, L. Multidrug and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Médecine Mal. Infect.* **2017**, *47* (1), 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2016.07.006>.
- (10) Rybniker, J.; Vocat, A.; Sala, C.; Busso, P.; Pojer, F.; Benjak, A.; Cole, S. T. Lansoprazole Is an Antituberculous Prodrug Targeting Cytochrome Bcl. *Nat. Commun.* **2015**, *6*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8659>.
- (11) Unissa, A. N.; Subbian, S.; Hanna, L. E.; Selvakumar, N. Overview on Mechanisms of Isoniazid Action and Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2016**, *45*, 474–492.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.004>.
- (12) Hu, Y.-Q.; Zhang, S.; Zhao, F.; Gao, C.; Feng, L.-S.; Lv, Z.-S.; Xu, Z.; Wu, X. Isoniazid Derivatives and Their Anti-Tubercular Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *133*, 255–267.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.002>.
- (13) Wang, T.; Jiao, W.; Shen, A. -dong. Progress on Mechanism of Ethambutol Resistance in Mycobacterium Tuberculosis. *Yi Chuan Hered.* **2016**, *38* (10), 910–917.
<https://doi.org/10.16288/j.ycz.16-111>.
- (14) Sun, L.; Zhang, L.; Wang, T.; Jiao, W.; Li, Q.; Yin, Q.; Li, J.; Qi, H.; Xu, F.; Shen, C.; Xiao, J.; Liu, S.; Mokrousov, I.; Huang, H.; Shen, A. Mutations of Mycobacterium Tuberculosis Induced by Anti-Tuberculosis Treatment Result in Metabolism Changes and Elevation of Ethambutol Resistance. *Infect. Genet. Evol.* **2019**, *72*, 151–158.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.027>.

- (15) Kayukova, L. A.; Berikova, E. A. Modern Anti-Tuberculosis Drugs and Their Classification. Part I: First-Line Drugs. *Pharm. Chem. J.* **2020**, *54* (6), 555–563. <https://doi.org/10.1007/s11094-020-02239-2>.
- (16) Young, E. F.; Perkowski, E.; Malik, S.; Hayden, J. D.; Durham, P. G.; Zhong, L.; Welch, J. T.; Braunstein, M. S.; Hickey, A. J. Inhaled Pyrazinoic Acid Esters for the Treatment of Tuberculosis. *Pharm. Res.* **2016**, *33* (10), 2495–2505. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1974-5>.
- (17) Diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis <https://www.e-yujm.org/journal/view.php?doi=10.12701/yujm.2020.00626> (cit. Dec 19, 2020).
- (18) Pontali, E.; Raviglione, M. C.; Migliori, G. B.; and the writing group members of the Global TB Network Clinical Trials Committee. Regimens to Treat Multidrug-Resistant Tuberculosis: Past, Present and Future Perspectives. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* **2019**, *28* (152). <https://doi.org/10.1183/16000617.0035-2019>.
- (19) Bahuguna, A.; Rawat, D. S. An Overview of New Antitubercular Drugs, Drug Candidates, and Their Targets. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40* (1), 263–292. <https://doi.org/10.1002/med.21602>.
- (20) Tetali, S. R.; Kunapaeddi, E.; Mailavaram, R. P.; Singh, V.; Borah, P.; Deb, P. K.; Venugopala, K. N.; Hourani, W.; Tekade, R. K. Current Advances in the Clinical Development of Anti-Tubercular Agents. *Tuberculosis* **2020**, *125*, 101989. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.101989>.
- (21) Quan, D.; Nagalingam, G.; Payne, R.; Triccas, J. A. New Tuberculosis Drug Leads from Naturally Occurring Compounds. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *56*, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.12.024>.
- (22) Bajeli, S.; Baid, N.; Kaur, M.; Pawar, G. P.; Chaudhari, V. D.; Kumar, A. Terminal Respiratory Oxidases: A Targetable Vulnerability of Mycobacterial Bioenergetics? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.589318>.
- (23) Lee, B. S.; Hards, K.; Engelhart, C. A.; Hasenoehrl, E. J.; Kalia, N. P.; Mackenzie, J. S.; Sviriaeva, E.; Chong, S. M. S.; Manimekalai, M. S. S.; Koh, V. H.; Chan, J.; Xu, J.; Alonso, S.; Miller, M. J.; Steyn, A. J. C.; Grüber, G.; Schnappinger, D.; Berney, M.; Cook, G. M.; Moraski, G. C.; Pethe, K. Dual Inhibition of the Terminal Oxidases Eradicates Antibiotic-Tolerant Mycobacterium Tuberculosis. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *n/a* (n/a), e13207. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013207>.
- (24) Matsoso, L. G.; Kana, B. D.; Crellin, P. K.; Lea-Smith, D. J.; Pelosi, A.; Powell, D.; Dawes, S. S.; Rubin, H.; Coppel, R. L.; Mizrahi, V. Function of the Cytochrome Bc1-Aa3 Branch of the Respiratory Network in Mycobacteria and Network Adaptation Occurring in Response to Its Disruption. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (18), 6300–6308. <https://doi.org/10.1128/JB.187.18.6300-6308.2005>.
- (25) Giuffrè, A.; Borisov, V. B.; Arese, M.; Sarti, P.; Forte, E. Cytochrome B_d Oxidase and Bacterial Tolerance to Oxidative and Nitrosative Stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2014**, *1837* (7), 1178–1187. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.016>.
- (26) Lansoprazole | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003495-199244020-00007> (cit. Dec 20, 2020).
- (27) Mdanda, S.; Baijnath, S.; Shobo, A.; Singh, S. D.; Maguire, G. E. M.; Kruger, H. G.; Arvidsson, P. I.; Naicker, T.; Govender, T. Lansoprazole-Sulfide, Pharmacokinetics of This

- Promising Anti-Tuberculous Agent. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31* (12), e4035.
<https://doi.org/10.1002/bmc.4035>.
- (28) Yates, T. A.; Tomlinson, L. A.; Bhaskaran, K.; Langan, S.; Thomas, S.; Smeeth, L.; Douglas, I. J. Lansoprazole Use and Tuberculosis Incidence in the United Kingdom Clinical Practice Research Datalink: A Population Based Cohort. *PLoS Med.* **2017**, *14* (11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002457>.
- (29) Iqbal, I.; Bajeli, S.; Akela, A.; Kumar, A. Bioenergetics of Mycobacterium: An Emerging Landscape for Drug Discovery. *Pathogens* **2018**, *7* (1), 24.
<https://doi.org/10.3390/pathogens7010024>.
- (30) N, S. D.; K, R. S. V.; R, S. Vibrational Spectra of Imidazoline-2-Thione and Imidazoline-2-One. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **1987**, *43* (4), 501–506.
- (31) Kruse, L. I.; Kaiser, C.; DeWolf, W. E.; Frazee, J. S.; Ross, S. T.; Wawro, J.; Wise, M.; Flaim, K. E.; Sawyer, J. L.; Erickson, R. W. Multisubstrate Inhibitors of Dopamine Beta-Hydroxylase. 2. Structure-Activity Relationships at the Phenethylamine Binding Site. *J. Med. Chem.* **1987**, *30* (3), 486–494.
<https://doi.org/10.1021/jm00386a008>.
- (32) Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362–2380
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00608>.
- (33) De, S. S.; Khambete, M. P.; Degani, M. S. Oxadiazole Scaffolds in Anti-Tuberculosis Drug Discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (16), 1999–2007.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.054>.
- (34) Waisser, K.; Kuneš, J.; Hrabálek, A.; Odlerová, Ž. New Groups of Potential Antituberculars: Bis(1-Aryltetrazol-5-Yl) Disulfides. Structure Activity Relationship. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1994**, *59* (1), 234–238.
- (35) Šink, R.; Sosič, I.; Živec, M.; Fernandez-Menendez, R.; Turk, S.; Pajk, S.; Alvarez-Gomez, D.; Lopez-Roman, E. M.; Gonzales-Cortez, C.; Rullas-Triconado, J.; Angulo-Barturen, I.; Barros, D.; Ballell-Pages, L.; Young, R. J.; Encinas, L.; Gobec, S. Design, Synthesis, and Evaluation of New Thiadiazole-Based Direct Inhibitors of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) for the Treatment of Tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (2), 613–624.
<https://doi.org/10.1021/jm501029r>.
- (36) Matsuda, K.; Yanagisawa, I.; Isomura, Y.; Mase, T.; Shibanuma, T. One-Pot Preparation of 1-Substituted Imidazole-2-Thione from Isothiocyanate and Amino Acetal. *Synth. Commun.* **1997**, *27* (20), 3565–3571.
<https://doi.org/10.1080/00397919708007078>.