

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A
FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Návrh, syntéza a hodnocení derivátů pyridinu jako
potenciálních antimikrobních sloučenin**

Diplomová práce

Andrea Bachtíková

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Juhás

Hradec Králové, 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové, srpen 2022

Andrea Bachtíková

Poděkování

Mé největší poděkování patří vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Janu Zitkovi PhD. a mému konzultantovi PharmDr. Martinu Juhásovi za odborné vedení, pomoc a ochotu při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kdo se podíleli na analýze připravených sloučenin a jejich biologickém testování.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 547) a projektem “Grantová schémata na UK” (reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935)

Obsah

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 CÍL PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 TUBERKULÓZA	11
2.2 ANTIMIKROBNÍ REZISTENCE	13
2.3 BIOLOGICKÁ ČÁST.....	15
2.3.1 <i>Dříve publikované látky typu pyridin + aminothiazol</i>	15
2.3.2 <i>Potenciální cíle derivátů</i>	18
2.4 VLASTNOSTI AMINOTHIAZOLU/AMINOXAZOLU	20
2.4.1 <i>Chelatační vlastnosti</i>	20
2.4.2 <i>PAINS (Pan-assay interference compounds)</i>	21
2.4.3 <i>Metabolická (ne)stabilita 2-aminothiazolu</i>	22
2.4.4 <i>Rozpustnost thiazol vs oxazol</i>	23
2.5 CHEMICKÁ ČÁST.....	24
2.5.1 <i>Příprava 2-aminothiazolu</i>	24
2.5.2 <i>Příprava 2-aminoxazolu</i>	25
2.5.3 <i>Vznik amidové vazby</i>	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, METODY	29
3.2 PRINCIP PŘÍPRAVY PRODUKTŮ	31
3.3 SYNTÉZA	32
3.3.1 <i>Syntéza acylchloridu</i>	32
3.3.2 <i>Reakce s CDI</i>	33
3.4 POSTUP PŘÍPRAVY PRODUKTŮ	34
3.5 ČIŠTĚNÍ SLOUČENIN	36
3.6 SOUHRN PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN.....	37
3.7 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ SLOUČENIN.....	49
3.7.1 <i>Antimykobakteriální aktivita</i>	49

3.7.2	<i>Antibakteriální aktivita</i>	51
3.7.3	<i>Antifungální aktivita</i>	52
3.7.4	<i>Cytotoxicita</i>	53
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
5	ZÁVĚR	63
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Název diplomové práce: Návrh, syntéza a hodnocení derivátů pyridinu jako potenciálních antimikrobních sloučenin

Řešitel: Andrea Bachtíková

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Martin Juhás

I v dnešní době je tuberkulóza celosvětovým problémem. Dle WHO se jedná o 2. nejčastější příčinu úmrtí na infekční onemocnění, přičemž u klasických antituberkulotik, která jsou v terapii využívána už desítky let, je čím dál častěji zaznamenáván výskyt rezistence. Tyto skutečnosti jsou hlavními důvody, proč je potřeba věnovat se výzkumu nových potenciálních léčiv.

V této diplomové práci je prezentován design, syntéza a hodnocení antimikrobních vlastností série substituovaných *N*-oxazolyl a *N*-thiazolylylkarboxamidů různých pyridinkarboxylových kyselin.

Finální sloučeniny byly charakterizovány ^1H a ^{13}C -NMR spektroskopií, IČ spektry, teplotou tání a HRMS (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením).

U získaných sloučenin byla testována aktivita *in vitro* proti *M. tuberculosis H37Rv*, *M. tuberculosis H37Ra* a čtyřem dalším, klinické méně významným mykobakteriálním kmenům. Dále byla u sloučenin testována antibakteriální aktivita na čtyřech kmenech G+ a čtyřech kmenech G- bakterií, antifungální aktivita na kvasinkách a plísních, a v neposlední řadě cytotoxicita sloučenin za využití HepG2 buněčné linie.

Obecně vykazovaly sloučeniny obsahující oxazoly vysokou aktivitu proti mykobakteriím, zejména *Mycobacterium tuberculosis* (nejlepší MIC H37Ra = 3,13 $\mu\text{g/mL}$), včetně multirezistentních kmenů. Slibná aktivita byla pozorována také proti různým bakteriálním a houbovým kmenům. Žádná ze sloučenin nebyla významně cytotoxická vůči buněčné linii HepG2.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Thesis title: Design, synthesis and evaluation of pyridine derivatives as potential antimicrobial compounds

Author: Andrea Bachtíková

Thesis supervisor: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Martin Juhás

Tuberculosis is a global problem even today. It is the second most common cause of death from infectious diseases according to the WHO and resistance to common antituberculosis drugs, which have been used in therapy for decades, increases. These facts are the main reasons why research into new potential drugs is needed.

This thesis presents design, synthesis and evaluation of antimicrobial properties of a series of substituted *N*-oxazolyl and *N*-thiazolyl carboxamides of different pyridinecarboxylic acids.

Final compounds were characterized by ^1H and ^{13}C -NMR spectroscopy, IR spectra, melting point and HRMS (High resolution mass spectrometry).

Obtained compounds were tested for *in vitro* activity against *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra and four other clinically less important mycobacterial strains. In addition, compounds were tested for antibacterial activity against four G+ and four G- bacterial strains, antifungal activity against yeasts and fungi, and finally cytotoxicity of the compounds using HepG2 cell line.

In general, oxazole-containing compounds showed high activity against mycobacteria, especially *Mycobacterium tuberculosis* (best MIC H37Ra = 3.13 $\mu\text{g/mL}$), including multidrug-resistant strains. Promising activity was also observed against various bacterial and fungal strains. None of the compounds was significantly cytotoxic against the HepG2 cell line.

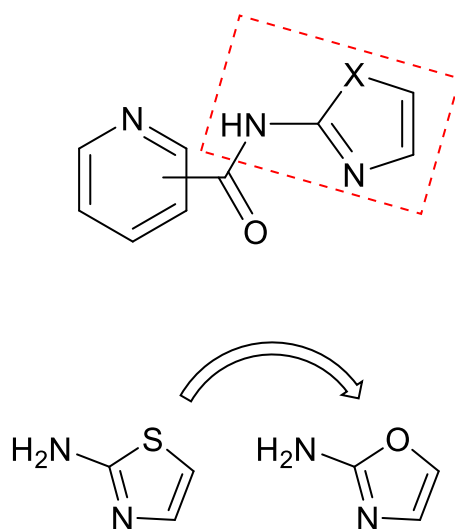
Seznam použitých zkratek

2-AMO	2-aminooxazol
2-AMT	2-aminothiazol
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CIP	ciprofloxacin
Clog <i>P</i>	vypočítaný log <i>P</i>
COVID-19	onemocnění způsobené virem SARS-CoV-2
CYP	cytochrom P450
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EcMetAP1	methionin aminopeptidáza u <i>Escherichia coli</i>
ELSD	detektor rozptylu světla odpařováním
EMB	ethambutol
FabH	β -ketoacyl-ACP-syntáza III
FAS I	syntáza mastných kyselin typu I
FAS II	syntáza mastných kyselin typu II
HepG2	buněčná linie jaterního karcinomu
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HTS	vysokokapacitní screening
IČ	infračervené
INH	isoniazid
KasA	β -ketoacyl-ACP-syntáza A
KasB	β -ketoacyl-ACP-syntáza B
KAS III	β -ketoacyl-ACP-syntáza III
Log <i>P</i>	rozdělovací koeficient mezi <i>n</i> -oktanol a vodu
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>

MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MetAP I	methionin aminopeptidáza typu I
MetAP II	methionin aminopeptidáza typu II
MIC	minimální inhibiční koncentrace
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MtMetAP	mykobakteriální methionin aminopeptidáza
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAINS	pan-assay interference compounds
pre-XDR-TB	preextenzivně rezistentní tuberkulóza
Pks13	polyketid syntáza 13
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RR-TB	tuberkulóza rezistentní vůči rifampicinu
SAR	vztah struktury a účinku
ScMetAP1	methionin aminopeptidáza u <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SI	index selektivity
TBC	tuberkulóza
TFFH	fluor- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylformamidinium hexafluorofosfát
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je navrhnout a připravit sérii sloučenin, které budou izosterní k dříve publikovaným 2-aminothiazolovým sloučeninám s prokázanou určitou antimikrobní aktivitou, kdy ve struktuře nových sloučenin se místo 2-aminothiazolu (2-AMT) bude nacházet fragment 2-aminoxazolu (2-AMO). Snahou je zjistit, zda izosterní záměnou síry za kyslík můžeme získat sloučeniny, které budou vykazovat stejnou (nebo dokonce lepší) antimikrobní aktivitu za případného zlepšení fyzikálně-chemických vlastností. Základní strukturu navrhovaných sloučenin se znázorněnou izosterní záměnou můžeme vidět na následujícím obrázku (Obrázek 1).



Obrázek 1: Obecná struktura sloučenin a znázorněná izosterní záměna

Připravené sloučeniny budou testovány *in vitro* na antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitu a na případnou cytotoxicitu.

V rámci práce budou syntetizovány sloučeniny obsahující jak fragment 2-aminoxazolu, tak fragment 2-aminothiazolu pro lepší možnost porovnání fyzikálně-chemických vlastností a antimikrobní aktivity.

2 Teoretická část

2.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené infekční onemocnění, které představuje jednu z hlavních příčin úmrtí. Až do pandemie koronaviru SARS-CoV-2 (COVID-19) byla tuberkulóza hlavní příčinou úmrtí způsobených jediným patogenem, čímž předběhla dokonce i HIV/AIDS.¹

Onemocnění provází lidstvo od nepaměti. Důkazy, v podobě kosterních pozůstatků, pocházející z mladší doby kamenné, tuberkulóza se vyskytovala ve starém Řecku i Římě. Ve středověku patřila k velmi častým příčinám úmrtí a patří mezi ně dodnes, především v rozvojových zemích.²

Z důvodů stálé aktuálnosti onemocnění vydává Světová zdravotnická organizace (WHO) každoročně *Global tuberculosis report* – dokument, jehož hlavními cíli je poskytnout kompletní a aktuální informace o nemoci, stavu epidemie, strategiích, opatřeních a cílech.¹

Původcem onemocnění je *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Jedná se o aerobní, tyčinkovitou, pomalu rostoucí bakterii.² Pro vysoký obsah lipidů v buněčné stěně je acidorezistentní – pomalu se barví a barvení je těžko vymyvatelné kyselinou i alkoholem, což je typickým znakem, díky kterému ji lze odlišit od ostatních mikrobů.³ Charakteristická je přítomnost mykolových kyselin, což jsou mastné kyseliny s 60–90 atomy uhlíku.³ Jedná se o nezbytnou složku mykobakteriální buněčné stěny. Povrch mykobakterií je díky nim hydrofobní, což snižuje mykobaktericidní aktivitu alveolárních makrofágů, díky čemuž mohou mykobakterie dlouhodobě přežívat v buňkách lidského těla.^{2,4}

Nákaza se zpravidla přenáší inhalační cestou, tedy pomocí kapének při kontaktu s nemocným, případně vdechnutím mykobakterií, které se volně vznášejí ve vzduchu. Ojedinele dochází k přenosu přímým kontaktem (tzv. inokulační tuberkulózy). Z uvedeného vyplývá, že branou vstupu tedy nejčastěji bývají dýchací cesty.²

Po vdechnutí jsou mykobakterie fagocytovány alveolárními makrofágy, dochází k hromadění T-lymfocytů v plicních alveolách a následnému vytvoření zánětlivého ložiska (tzv. tuberkulózní uzlík). Tato fáze onemocnění bývá označována jako primární

infekce a zpravidla bývá asymptomatická.^{5,2} Rozvoj onemocnění a přechod do aktivní formy závisí na imunokompetenci hostitele (např. u osob s HIV je zvýšené riziko přechodu do aktivní formy).⁶ Imunitní systém může mykobakterie zcela zlikvidovat, nebo mohou v těle zůstat v latentní formě. Ve většině případů dochází díky rozvoji buněčné imunity ke spontánnímu zhojení zánětlivých ložisek a jediným znakem prodělané infekce je pozdní přecitlivělost (tzv. tuberkulinová reakce), zprostředkovaná paměťovými T-lymfocyty. Po určité době ovšem může dojít k reinfekci (inhalací nových mykobakterií) nebo reaktivaci onemocnění po dlouhém období latence, které může trvat i několik let. Tato chronická forma bývá označována jako sekundární nebo také postprimární infekce. V této fázi dochází k destrukci plicní tkáně (nebo jiných tkání v závislosti na lokalizaci).^{5,2}

Tuberkulóza může postihnout prakticky jakýkoliv orgán v těle, ovšem nejčastěji bývají postižené již zmiňované plíce. V rámci mimoplicní lokalizace se může jednat o postižení pleury, lymfatických uzlin, kostí, kloubů nebo urogenitálního traktu.⁷

První dva měsíce jsou pacientům podávány léky první linie (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol), po nichž následuje další období 4–6 měsíců s rifampicinem a isoniazidem, aby byli plně vyléčeni.⁸

TBC se vyskytuje ve všech částech světa. V roce 2020 se nejvíce nových případů vyskytlo v regionu WHO v jihovýchodní Asii (43 % nových případů), dále v africkém regionu WHO (25 % nových případů) a v regionu WHO v západním Pacifiku (18 % nových případů). Dvě třetiny nových případů připadá těmto osmi zemím: Indie, Čína, Indonésie, Filipíny, Pákistán, Nigérie, Bangladěš a Jihoafrická republika. Pandemie COVID-19 zvrátila léta trvající celosvětový pokrok ve snižování počtu umírajících na TBC, přičemž poprvé došlo k meziročnímu nárůstu (o 5,6 %) od roku 2005 a celkový počet úmrtí v roce 2020 se vrátil na úroveň roku 2017. Celosvětový počet úmrtí oficiálně klasifikovaných jako způsobené TBC v roce 2020 byl 1,3 milionu, tedy téměř dvojnásobný než v roce 2015.¹

V České republice v roce 2020 bylo hlášeno celkem 368 případů onemocnění tuberkulózou všech forem a lokalizací (3,4 případu na 100 000 obyvatel). Při porovnání s předchozím rokem se stav hlášených případů snížil (o 96 případů méně oproti roku 2019). Z dlouhodobého hlediska výskyt TBC u nás vykazuje trvale klesající trend a v mezinárodním srovnání ČR patří k zemím s nízkým výskytem tohoto onemocnění.⁹

V roce 2020 bylo nahlášeno celkem 24 úmrtí na TBC, kdy počty mohou zahrnovat i dodatečně nahlášená úmrtí za předchozí období.⁹

2.2 Antimikrobní rezistence

Dramatický nárůst celosvětového výskytu tuberkulózy a vznik rezistence Mtb na léčiva představuje významnou výzvu pro léčbu tuberkulózy.¹⁰

Mtb je od přírody vybavena přirozenou vnitřní rezistencí vůči většině antibiotik, ale často také rezistenci získává v reakci na antibiotika. Kombinace vnitřních a získaných mechanismů rezistence k léčivům, které zahrnují genetické mutace, chromozomální změny, nepropustnost buněčného obalu, eflux léčiv, degradaci a modifikaci léčiv, změnu cíle a maskování cíle, činí buňky Mtb rezistentní k většině tříd antibiotik,¹⁰ což nejen omezuje použití stávajících antibiotik, ale také ztěžuje vývoj nových léčiv.¹¹

Rezistentní kmeny Mtb se objevují v nemocničním i komunitním prostředí a vykazují různé úrovně rezistence vůči léčivům.¹⁰ WHO pro klasifikaci rezistence TBC na léčiva používá pět kategorií. Jedná se o TBC rezistentní na isoniazid, TBC rezistentní na rifampicin (RR-TB), multirezistentní TBC (MDR-TB), preextenzivně rezistentní TBC (pre-XDR-TB) a extenzivně rezistentní TBC (XDR-TB).¹

RR-TB je rezistence pouze vůči rifampicinu, nikoli vůči jiným léčivům první nebo druhé linie. MDR-TB je definována jako rezistence vůči nejméně dvěma nejsilnějším lékům proti TBC, isoniazidu a rifampicinu. Léčba RR-TB a MDR-TB je obvykle delší, trvá 18 měsíců nebo déle a sestává z vybraných léčiv první linie spolu s různými kombinacemi léčiv druhé linie, které jsou dražší a toxičtější. XDR-TB je forma tuberkulózy, která je definována jako MDR-TB plus rezistence na nejméně jedno léčivo z každé ze dvou důležitých tříd léčiv druhé linie (fluorochinolonů a injekčních přípravků) používaných v režimu léčby MDR-TB. To znamená, že zahrnuje rezistenci vůči isoniazidu a rifampicinu, navíc rezistenci vůči některému z fluorochinolonů (jako je levofloxacin nebo moxifloxacin) a vůči alespoň jednomu ze tří injekčních léčiv druhé linie (amikacin, kapreomycin nebo kanamycin).^{12,13}

Začátkem roku 2021 WHO nově definovala formu tuberkulózy označovanou jako pre-XDR-TB, čímž zdůraznila závažnost rezistentních forem. Jako pre-XDR-TB je označována tuberkulóza splňující definici MDR-TB nebo RR-TB, která je zároveň rezistentní vůči kterémukoliv z fluorochinolonů.¹⁴

Dlouhodobá léčba TBC často vede k nedodržování lékového režimu pacienty a má za následek rychlou evoluci Mtb z monorezistentní na MDR-TB a XDR-TB. Základním krokem v boji proti rezistenci mykobakterií k léčivům je pochopení mechanismů, které se podílejí na vzniku rezistence k antibiotikům.¹⁰

Mycobacterium tuberculosis si vyvinula řadu molekulárních mechanismů, které umožňují neutralizovat cytotoxicitu většiny toxických chemických látek včetně antibiotik. Jedná se o přirozenou, tzv. vnitřní rezistenci.¹¹

Získaná rezistence k léčivům u Mtb vzniká primárně v důsledku mutací chromozomu, genů kódujících cíle léčiv, nebo enzymů aktivujících léčiva.^{15,16} Mutace se vyvíjejí v důsledku nepřetržitého vystavení léčivům během dlouhodobého léčebného režimu a nedodržování léčebného režimu. Koncentrace léčiv je tedy hlavním faktorem ovlivňujícím mutace spojené s rezistencí.¹¹ Získaná rezistence je přenosná. Neúčinné léky nebo nízké dávky léků proti tuberkulóze používané během léčby mohou poskytnout bakteriím výhodu k přežití ve formě selekce rezistentních kmenů pro další množení.⁸

Zjištění lékové rezistence vyžaduje bakteriologické potvrzení TBC a testování na lékovou rezistenci pomocí rychlých molekulárních testů, kultivačních metod nebo sekvenačních technologií. Léčba vyžaduje podávání léčiv druhé linie po dobu 9 až 20 měsíců, podpořenou poradenstvím a monitorováním nežádoucích účinků. V roce 2020 WHO doporučila nový kratší (9–11 měsíců) a plně orální režim pro pacienty s MDR-TB.¹

Bylo zjištěno, že v roce 2017 bylo celosvětově hlášeno 558 000 případů TBC rezistentních na rifampicin (RR-TB) a z nich 82 % představovala multirezistentní TBC (MDR-TB).¹⁰

V České republice byl za rok 2020 na citlivost k antituberkulotikům testován materiál od 258 pacientů. Ve 20 případech (7,8 %) byla zjištěna rezistence na isoniazid, v 16 případech (6,2 %) na streptomycin, ve 12 na pyrazinamid (4,7 %), v 10 případech na rifampicin (3,9 %) a v 7 na etambutol (2,7 %). Multirezistence byla zjištěna v 10 případech (3,9 %).⁹

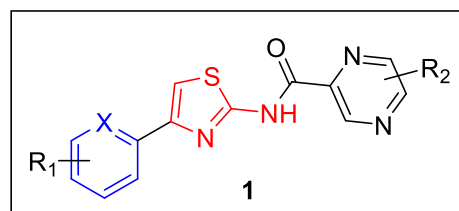
2.3 Biologická část

2.3.1 Dříve publikované látky typu pyridin + aminothiazol

Sloučeniny obsahující ve své struktuře 2-aminothiazolový skelet jsou známé širokým spektrem biologických aktivit. Mohou vykazovat například protinádorové, antivirové, antibakteriální, antimykotické, antituberkulotické, antiprotozoální, antioxidační, antihypertenzní, nebo protizánětlivé účinky.¹⁷

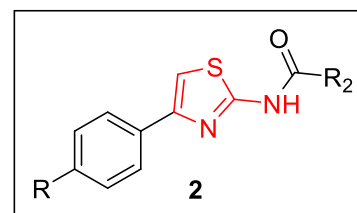
Design sloučenin, kterým se tato diplomová práce věnuje je odvozen od dříve publikovaných antibakteriálně a antimykobakteriálně účinných sloučenin – především inhibitorů β -ketoacyl-ACP-syntázy III (FabH).

Jedná se například o hybridní sloučeniny připravené Zitkem a kol.,¹⁸ založené na kombinaci antituberkulotika první linie pyrazinamidu (PZA) a 4-arylthiazol-2-aminu, dříve identifikovaného



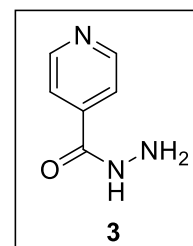
antimykobakteriálního skeletu.¹⁹ Bylo připraveno 18 sloučenin (**1**), z nichž neaktivnější 6-chlor-*N*-[4-(4-fluorfenyl)thiazol-2-yl]pyrazin-2-karboxamid s hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC) 0,78 $\mu\text{g/ml}$ měla zároveň nejširší spektrum aktivity (*M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*).¹⁸

Dalším strukturně podobným sloučeninám, které taktéž prokázali účinky proti Mtb, se věnovali Li a kol.²⁰ Připravili dvě série sloučenin vytvořením amidové vazby



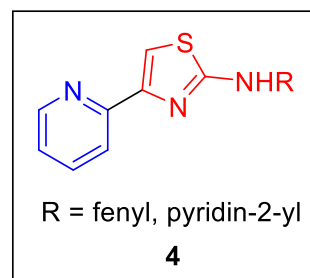
mezi aromatickou kyselinou a 4-fenylthiazol-2-aminem nebo 4-(4-bromfenyl)thiazol-2-aminem. Tyto thiazolové deriváty (**2**) byly po absolvování enzymových testů vyhodnoceny jako silné inhibitory FabH s hodnotami IC_{50} v rozmezí od 5,8 μM do 48,1 μM . Většina syntetizovaných sloučenin zároveň vykazovala antibakteriální aktivitu, kdy hodnoty MIC těchto sloučenin se pohybovaly od 1,56 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$.²⁰

Pyridin – dusíkatý, šestičlenný heterocyklus – je přirozenou součástí mnoha molekul, jako jsou vitaminy, koenzymy a alkaloidy. Pyridinové skelety jsou známé pro své antimikrobiální, antivirové, antioxidační, protizánětlivé, antiamebícké, antidiabetické, antimalarické



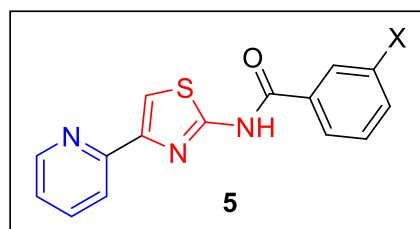
a antipsychotické vlastnosti, proto bývají součástí mnoha léčiv.²¹ Příkladem nám může být léčivo první linie při léčbě tuberkulózy – isoniazid (**3**).

V rámci vysokokapacitního screeningu (HTS) provedeného Ananthanem a kol.²² (prostřednictvím systému Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility) byla testována rozsáhlá knihovna sloučenin na aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv. Jako jeden z hitů byl označen



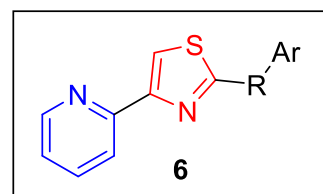
4-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminový skelet (**4**), který kombinuje oba dva výše zmíněné fragmenty (jak fragment 2-aminothiazolu tak fragment pyridinu). Databáze zahrnovala 18 sloučenin, obsahujících ve své struktuře zmíněný skelet s arylovým nebo arylalkylovým substituentem na aminoskupině v poloze 2. Analýza vztahu struktury a účinku prokázala, že pyridylový substituent v poloze 4 thiazolového kruhu (zejména 2-pyridylový substituent), je klíčovým strukturálním požadavkem pro silnou aktivitu proti Mtb. Při porovnání údajů o aktivitě vyplynulo, že 2-pyridylové izomery jsou vysoce aktivní, zatímco odpovídající 4-pyridylové izomery jsou buď slabě aktivní nebo neaktivní. Taktéž 3-pyridylový izomer se ukázal jako neaktivní.²²

V návaznosti na tuto studii, definující poměrně jasné vztahy struktury a účinku (SAR), z něhož vyplývá, že centrální thiazolový fragment a 2-pyridyl připojený na C4 thiazolu nelze modifikovat bez



ztráty účinku, byly připraveny N-2 arylové deriváty (**5**) Meissnerem a kol.²³ Zavedením substituovaných benzoylových skupin na N-2 aminothiazolu se podařilo několikanásobně zvýšit aktivitu původního hitu, kdy jako jeden z nejslibnějších analogů se ukázal N-(3-chlorbenzoyl)-4-(2-pyridinyl)-1,3-thiazol-2-amin s MIC = 0,024 μM.²³

Od 4-(pyridin-2-yl)thiazol-2-aminového skeletu byly odvozeny další sloučeniny. Mjambili a kol.²⁴ připravili další substituované N-benzoylderiváty (**6**), které byly testovány na antimykobakteriální a antiplazmoidální aktivitu. Z analýzy



SAR vyplynulo, že optimální antimykobakteriální aktivitu vykazují sloučeniny s 2-pyridylovým kruhem v poloze 4 thiazolového skeletu a substituovaným fenylem spojeným s thiazolem amidovým linkerem. Nejúčinnějším substituentem na fenylové

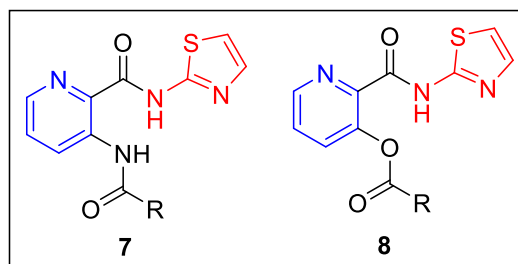
části byl 4-Br. U sloučenin se substituovaným fenylem se hodnoty MIC proti Mtb H37Rv pohybovaly v rozmezí od 0,8 μM do 18,6 μM .²⁴

Dále se obměňám těchto sloučenin věnoval Kesicki a kol.,²⁵ kteří sledovali vliv substituce thiazolového jádra v poloze C2 a C4 a záměn thiazolového jádra na aktivitu sloučenin. Zjistili, že poloha C2 thiazolu může pojmout řadu lipofilních substituentů, zatímco pozice C4 i záměna thiazolového jádra jsou citlivé na změny.²⁵

Všechny čtyři zmiňované studie se shodují na tom, že pyridin-2-yllová skupina v poloze C4 thiazolového kruhu je pro aktivitu nezbytná a její náhrada vedla ke ztrátě aktivity.

Fragment pyridinu a 2-aminothiazolu ve své struktuře obsahují také sloučeniny, u kterých byla prokázána určitá schopnost inhibice bakteriální methionin aminopeptidázy (MetAP). Při screeningu knihovny potenciálních inhibitorů methionin aminopeptidázy u *Escherichia coli* (EcMetAP1) byl jako hit označen *N*-(1,3-thiazol-2-yl)pyridin-2-karboxamid. Luo a kol.²⁶ připravili několik strukturních obměn této sloučeniny a výsledky ukázaly, že thiazol-2-ylamid kyseliny pyridin-2-karboxylové je klíčovým strukturním prvkem pro účinnou inhibici enzymu.²⁶

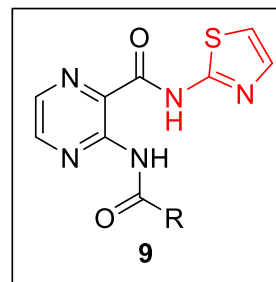
Dále byla připravena knihovna 3-substituovaných thiazol-2-ylamidů kyseliny pyridin-2-karboxylové (**7** a **8**), které byly hodnoceny z hlediska jejich inhibiční aktivity vůči methionin aminopeptidáze



u *Escherichia coli* (EcMetAP1) a *Saccharomyces cerevisiae* (ScMetAP1). Ze 41 testovaných sloučenin vykazovaly všechny sloučeniny inhibici EcMetAP1 s hodnotami IC_{50} nižšími než 10 μM a většina z nich vykazovala lepší aktivitu než původní hit ($\text{IC}_{50} = 5,0 \mu\text{M}$ EcMetAP). Bylo prokázáno, že zavedením 3-*N*-acylové skupiny nebo 3-*O*-acylové skupiny došlo k výraznému zvýšení aktivity vůči EcMetAP1 a ScMetAP1. Pouze pár sloučenin bylo testováno na antibakteriální aktivitu a jejich aktivita byla ve většině případů slabá. Na aktivitu proti Mtb sloučeniny testovány nebyly.²⁶

Juhásem a kol.²⁷ byla připravena pyrazinová analoga výše zmíněných sloučenin, u kterých inhibice mykobakteriální MetAP testována byla. Z enzymatických testů vyplynulo, že nejvyšší aktivitu ukázaly 3-substituované *N*-(thiazol-2-yl)pyrazin-2-

karboxamidy (9) substituované v poloze 3 benzamidem. Ukázalo se, že ve většině případů dochází k dalšímu zvýšení inhibiční aktivity sloučenin zavedením substituentu do polohy 2 fenylového jádra benzamidu. Nejvyšší aktivita byla pozorována při substituci 2-Br. Míra inhibice byla silně závislá na použitém kovovém kofaktoru, přičemž nejvyšší inhibice byla zaznamenána v přítomnosti Ni²⁺. Několik sloučenin také vykazovalo průměrnou účinnost *in vitro* proti Mtb H37Ra i H37Rv.²⁷



2.3.2 Potenciální cíle derivátů

2.3.2.1 FabH

Jak už bylo zmíněno, mykolové kyseliny jsou mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem, které představují základní složky buněčné stěny mykobakterií. Vzhledem k jejich významu umožňuje charakterizace klíčových enzymů, podílejících se na biosyntéze, nejen pochopit jejich úlohu ve fyziologii mykobakterií, ale může také vést k identifikaci nových cílů pro léčiva. Mykoláty jsou syntetizovány nejméně dvěma samostatnými elongačními systémy, syntázami mastných kyselin typu I (FAS-I) a typu II (FAS-II). Mezi složkami FAS-II je značný zájem věnován kondenzačním enzymům, které katalyzují tvorbu vazeb uhlík-uhlík. Jedná se o enzymy, které se podílejí na iniciaci (FabH), elongaci (β -ketoacyl-ACP-syntázy A a B - KasA a KasB) a terminaci (polyketid syntáza 13 - Pks13), vedoucí k plnohodnotným mykolovým kyselinám.²⁸

Enzym FabH (β -ketoacyl-ACP-syntáza III neboli KAS III) je jedním z velmi slibných antimikrobních cílů, který hraje klíčovou roli v počátečním kroku biosyntézy mastných kyselin pomocí FAS typu II.²⁹ Je všudypřítomný u bakterií a je nezbytný pro jejich přežití. Vykazuje nízkou homologii s kondenzačními enzymy vyskytujícími se u člověka, proto se KAS III stal atraktivním cílem pro vývoj nových antibakteriálních látek.³⁰

2.3.2.2 MtMetAP1

Mykobakteriální methionin aminopeptidáza (MtMetAP) je považována za další slibný cíl. Methionin aminopeptidázy (MetAP) se řadí mezi metaloenzymy a jsou přítomné ve všech živých organismech. Jsou zodpovědné za štěpení N-koncového methioninu ze vznikajících proteinů a polypeptidů. Byly identifikovány dva typy – MetAP I a MetAP II. U prokaryotních organismů se vyskytuje pouze MetAP typu I, zatímco eukaryotní organismy mají oba typy.^{31,32} Přítomnost MetAP je nezbytná pro

životaschopnost buněk a bylo prokázáno, že pro *E. coli* nebo *Salmonella typhimurium* je narušení genu pro MetAP smrtelné. Na rozdíl od většiny prokaryot, *M. tuberculosis* má dvě izoformy – MtMetAP1a a MtMetAP1c. Obě izoformy MtMetAP mají méně než 48% podobnost s lidskými MetAP, což z nich činí poměrně vhodný cíl antimikrobní terapie.³³

2.4 Vlastnosti aminothiazolu/aminoxazolu

2.4.1 Chelatační vlastnosti

V literatuře bylo popsáno velké množství sloučenin na bázi 1,3-thiazolu jako ligandů, které propůjčují sloučeninám schopnost koordinovat různé kovové ionty. Koordináční schopnost thiazolylových ligandů je z velké části přisuzována přítomnosti atomů dusíku a síry v pětičlenném kruhu jako potenciálních donorů elektronů. Pokud jde o koordináční schopnost atomů S a N v 1,3-thiazolovém kruhu, běžně je atom dusíku (díky vyšší elektronegativitě a tím pádem vyšší nukleofilitě) mnohem účinnějším donorem než atom síry. Kromě toho je při určování přesné povahy těchto interakcí ligandu s kovem důležitá povaha kovu i substituentů na heterocyklickém ligandu.^{34,35,36,37}

Schopnost koordinovat ionty kovů mají i další thiazolové deriváty, především ty, které mají v poloze 2 zaveden elektron-donorový substituent.³⁴ Jedním z takových derivátů je právě 2-aminothiazol. Obdobné schopnosti má i jeho kyslíkatý izoster 2-aminoxazol. Oba zmíněné ligandy nesou ve svém heterocyklu celkem tři nukleofilní, potenciálně vazebná centra: endocyklický atom N, exocyklický N (NH₂ skupina) a endocyklický atom S (resp. O). I přes existenci více vhodných donorových atomů, ve většině případů koordinace s kovovými ionty, zůstává nejpravděpodobnějším donorem heterocyklický dusík.^{34,38}

Z 2-aminothiazolů a 2-aminoxazolů mohou být připraveny Schiffovy baze reakcí primární aminoskupiny s aldehydem nebo ketonem, kdy dochází k náhradě karbonylové skupiny aldehydu/ketonu iminoskupinou. Vzniklá azomethinová C=N vazba dodává vzniklým Schiffovým bazím schopnost vytvoření komplexu s kovy prostřednictvím koordinace s atomem dusíku.³⁹

2.4.2 PAINS (Pan-assay interference compounds)

Některé sloučeniny obsahující ve své struktuře fragment 2-aminotiazolu jsou považovány za potenciální PAINS.⁴⁰

Bylo identifikováno celkem 14 podtříd 2-AMT, které byly zařazeny do kategorie PAINS.⁴⁰

Pan-assay interference compounds (PAINS) jsou sloučeniny poprvé popsány Baellem a Hollowayem a jsou charakteristické přítomností strukturních rysů, které podporují nespécifickou aktivitu sloučenin vůči mnoha proteinovým cílům.⁴¹ Tyto strukturní rysy mohou sloučeninám propůjčovat schopnost interferovat s biologickými testy a poskytovat tak falešně pozitivní výsledky (například v rámci HTS).⁴⁰

Mechanismy jsou různé a zahrnují například reaktivitu s biologickými a biochemickými nukleofily (jako jsou thioly a aminy); fotoreaktivitu; chelataci kovů (která může způsobovat interferenci s proteiny, testovacími činidly, nebo může vnášet kontaminanty v podobě těžkých kovů); redoxní aktivitu; fyzikálně-chemické interference (jako je tvorba micel); nebo fotochromní vlastnosti, které mohou interferovat s absorpcí či fluorescencí, kterých je typicky využíváno při hodnocení testů.⁴²

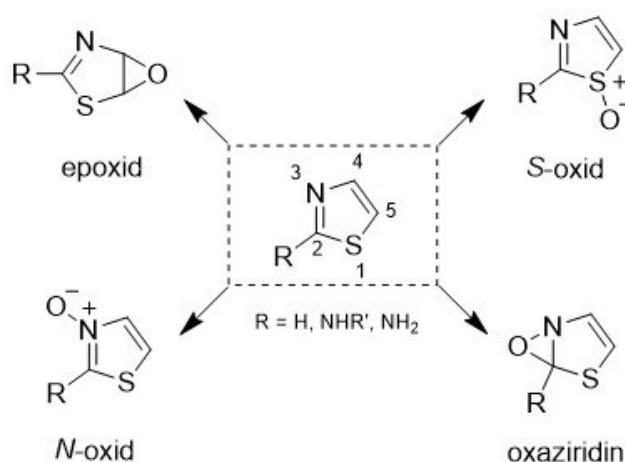
Sloučeniny, které mají známé jádro PAINS, by tedy měly být do optimalizace struktury zahrnovány s velkou opatrností, protože je poměrně vysoká pravděpodobnost, že se ukáže, že původní slibné hity nejsou progresivní a často vedou ke stanovení matoucích vztahů struktury a účinku.⁴³

V současné době jsou široce využívány elektronické filtry, které mohou zpracovat stovky a tisíce sloučenin během několika sekund a používají se k identifikaci PAINS s cílem vyloučit je z další analýzy.⁴²

2.4.3 Metabolická (ne)stabilita 2-aminothiazolu

Některé chemické funkční skupiny se podílejí na vzniku toxických reaktivních metabolitů a jsou hlášeny jako strukturní výstrahy.

Je známo, že léčiva obsahující thiazolové a 2-aminothiazolové skupiny vytvářejí reaktivní metabolity reakcí katalyzovanou cytochromem P450 (CYP). Tyto reaktivní metabolity mohou kovalentně modifikovat základní buněčné makromolekuly, vést k toxicitě a vyvolávat idiosynkratické nežádoucí účinky léčiv. Biotransformace thiazolové a 2-aminothiazolové skupiny může vést k reaktivním metabolitům typu epoxidu, *S*-oxidu, *N*-oxidu a oxaziridinu (Obrázek 2).⁴⁴



Obrázek 2: Možné cesty metabolické biotransformace thiazolu, převzato a upraveno z:⁴⁴

Epoxidace thiazolu je termodynamicky a kineticky výhodnější ve srovnání s *S*-oxidací, *N*-oxidací a tvorbou oxaziridinu. Ačkoli energetická bariéra pro tvorbu oxaziridinu je pouze nepatrně větší než pro epoxidaci, metabolit oxaziridinu je mnohem méně stabilní. Lze tedy konstatovat, že tvorba epoxidu na thiazolovém kruhu je nejvýhodnější reakcí zprostředkovanou CYP. Epoxidace probíhá snadněji v přítomnosti aminoskupiny v poloze C2.⁴⁴

Thiazolový kruh může snadno podléhat oxidačnímu štěpení katalyzovanému CYP a vzniku α -dikarbonylových metabolitů a thioamidových derivátů. Právě thioamidové metabolity bývají považovány za zdroj toxicity thiazolů.⁴⁵

Oxidačním reakcím, které vedou ke vzniku toxických metabolitů, je možné se vyhnout zavedením alkylové skupiny do polohy C5 thiazolu (nebo 2-aminothiazolu).⁴⁴

2.4.4 Rozpustnost thiazol vs oxazol

Rozpustnost má zásadní význam pro schopnost sloučenin stát se léčivem. Sloučeniny s nízkou rozpustností značně ztěžují vývoj léčiv a mohou způsobovat problémy při testech *in vitro* a *in vivo*.⁴⁶

V literatuře bývá heterocyklický thiazol označován jako dobře rozpustný v etheru a alkoholu, ovšem málo rozpustný ve vodě.^{47,48}

Oxazoly jsou označovány taktéž jako nerozpustné ve vodě (s výjimkou některých methyloxazolů), jsou rozpustné v alkoholu, etheru, kyselině octové a benzenu.⁴⁹

Azzali a kol. ve své publikaci zaznamenali, že sloučeniny obsahující ve své struktuře 2-aminooxazol by mohli mít oproti 2-aminothiazolovým derivátům některé výhody, jako právě lepší rozpustnost.⁵⁰

V rámci hodnocení rozpustnosti námi připravených sloučenin byla zaznamenána shoda s výše zmíněným tvrzením. Při porovnání několika dvojic izosterních derivátů vyšší rozpustnost ve vodě byla zaznamenána u 2-aminooxazolových sloučenin.⁵¹ Ovšem pro vyvození jednoznačného závěru ohledně zlepšené rozpustnosti záměnou 2-aminothiazolu za 2-aminooxazol by bylo zapotřebí hodnocení většího souboru sloučenin.

2.5 Chemická část

2.5.1 Příprava 2-aminothiazolu

Thiazoly obecně lze připravit Hantzschovou syntézou, Gabrielovou syntézou nebo Cook–Heilbornovou syntézou.⁵²

Jednou z nejstarších metod přípravy 2-aminothiazolů je Hantzschova thiazolová syntéza. Touto reakcí je možné připravit poměrně čisté sloučeniny ve vysokém výtěžku z α -bromoketonu a thioamidu,^{53,54} ovšem je možné k přípravě použít i další α -halogenketony/ α -halogenaldehydy.⁵⁵ Příkladem je chloracetaldehyd, který je schopen reagovat s thioamidem (Schéma 1).⁵⁶

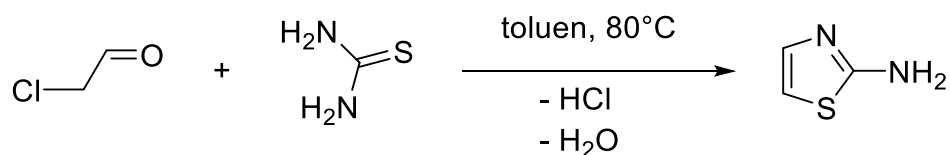
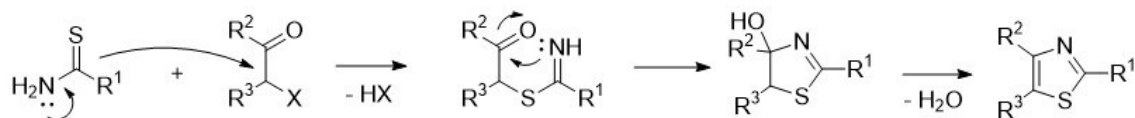


Schéma 1: Příprava 2-aminothiazolu Hantzschovou syntézou, převzato a upraveno z:⁵⁷

Reakční mechanismus spočívá v nukleofilním ataku atomu síry thioamidu (resp. thioamidu) na alfa uhlík α -halogenkarbonylu za vzniku meziprojektu, který následnou dehydratací vede k odpovídajícímu thiazolu (Obrázek 3).⁵²

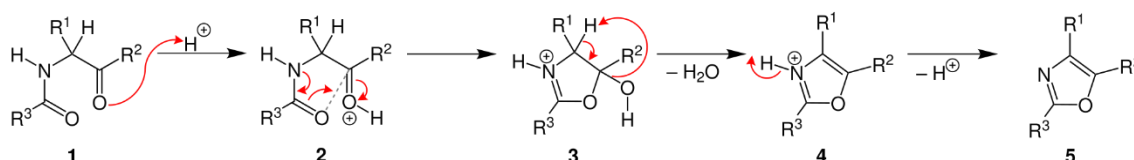


Obrázek 3: Reakční mechanismus Hantzschovy thiazolové syntézy, převzato a upraveno z:⁵²

Jednou z možných variant přípravy je i reakce acetaldehydu s thioamidem za použití vhodného katalyzátoru (jako například montmorillonit-K nebo jód).^{58,59}

2.5.2 Příprava 2-aminooxazolu

Oxazoly bývají často připravovány pomocí Robinsonovy-Gabrielovy syntézy. Jedná se o reakci, při níž α -acylaminoketon podléhá intramolekulární cyklizaci a dehydrataci za vzniku oxazolového kruhu. Mechanismus reakce lze vidět níže (Obrázek 4). Ke katalýze reakce je zapotřebí dehydratační činidlo, kterým může být PCl_5 , POCl_3 , P_2O_5 , SOCl_2 , nebo silná minerální kyselina (např. H_2SO_4).^{60,61}



Obrázek 4: Mechanismus Robinsonovy-Gabrielovy syntézy, převzato z internetového zdroje⁶²

Dále mohou být oxazoly připraveny z amidů a α -halogenketonů nebo α -halogenaldehydů. Tato metoda je podobná přípravě thiazolů, avšak oxazoly v porovnání s thiazoly vznikají při vyšších teplotách a v nižších výtěžcích (v některých případech jsou výtěžky tak nízké, že izolace oxazolu je velmi problematická). Při přípravě oxazolů je obvyklé zahřívát reaktanty při 120 °C po dobu jedné až dvou hodin, zatímco thiazoly se snadno tvoří již při mírném zahřívání.⁴⁹

Pro přípravu 2-aminooxazolů se většinou využívá dvou metod. První zahrnuje reakci α -halogenkarbonylové sloučeniny s ureou v dimethylformamidu při vysoké teplotě několik hodin. Ovšem pro některé tepelně nestálé deriváty 2-aminooxazolů tuto cestu syntézy nelze použít. Důležitá je kontrola teploty reakce z důvodu možné tvorby nežádoucích meziproductů (imidazol, imidazolon).⁶³

Druhou možností je reakce α -hydroxyketonu (glykolaldehydu) s kyanamidem (nebo substituovaným kyanamidem). Reakce se provádí při 40-50 °C ve vodném prostředí nebo v přítomnosti minerální kyseliny, plnící v tomto případě funkci katalyzátoru. Lepší výtěžky poskytuje reakce v tetrahydrofuranu (THF) při vysokém pH (10-12).⁶³ Reakční schéma můžeme vidět níže (Schéma 2).

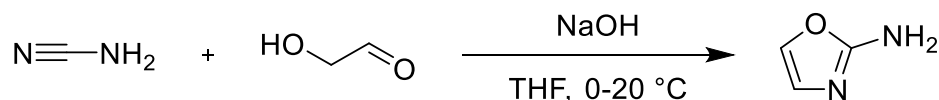


Schéma 2: Příprava 2-aminooxazolu, převzato a upraveno z: ⁶⁴

2.5.3 Vznik amidové vazby

Amidová vazba se obvykle vytváří spojením karboxylových kyselin a aminů. Ovšem kvůli přirozené rovnováze mezi karboxylovou kyselinou a aminem směřující k tvorbě solí není možná přímá kondenzace těchto dvou funkčních skupin za laboratorní teploty.⁶⁵ Pro tento typ reakce je potřeba vysokých teplot (až >200 °C),⁶⁶ které jsou obvykle škodlivé pro integritu substrátů (kdy může docházet k jejich tepelnému rozkladu). Z tohoto důvodu bývá nutné karboxylovou kyselinu nejprve aktivovat.⁶⁷ Karboxylové kyseliny mohou být aktivovány na acylhalogenidy, acylazidy, acylimidazoly, anhydridy, estery a další.

Mechanismus aktivace spočívá v záměně hydroxylové funkční skupiny karboxylové kyseliny za lépe odstupující skupinu a vzniku meziprojektu, který umožní atak aminoskupiny na elektrondeficientní karboxylový uhlík.^{68,69}

Existují různé způsoby tvorby amidové vazby:

- reaktivní acylační činidlo se vytváří z kyseliny v samostatném kroku před reakcí s aminem
- acylační činidlo se vytváří *in situ* z kyseliny v přítomnosti aminu přidáním aktivčního (couplingového) činidla.^{68, 69}

2.5.3.1 ACYLHALOGENIDY

Jako jednu z nejjednodušších metod aktivace karboxylové kyseliny je považována tvorba acylchloridu. K tomuto účelu je možno využít thionylchlorid, oxalylchlorid, chlorid fosforitý, trichlorid fosforylu a pentachlorid fosforylu. Mechanismus aktivace při použití thionylchloridu a oxalylchloridu je patrný ze schématu (Schéma 3).⁶⁹

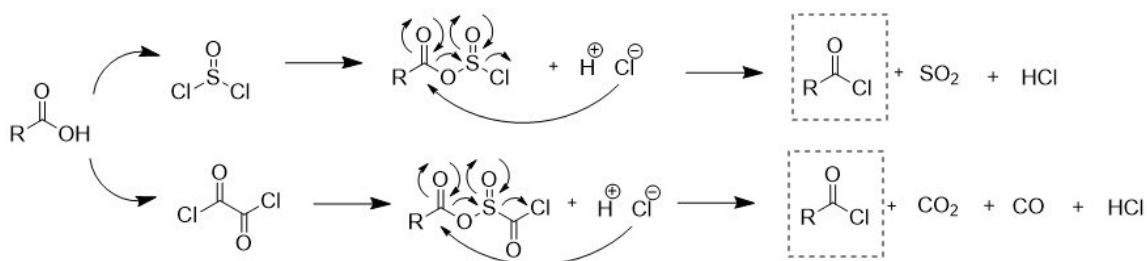


Schéma 3: Mechanismus aktivace karboxylové kyseliny pomocí oxalylchloridu a thionylchloridu, převzato a upraveno z: ⁶⁹

Obě reakce mohou být podpořeny přidávkem katalytického množství *N,N*-dimethylformamidu (DMF).⁷⁰

Jednou z hlavních nevýhod použití výše uvedených chloračních činidel je vznik kyseliny chlorovodíkové jako vedlejšího produktu, což může působit problematicky při použití substrátů, které jsou citlivé na přítomnost kyseliny a vyžadují nekyselé reakční podmínky.⁶⁹

Amidová vazba potom vzniká reakcí acylchloridu s vybraným aminem. Vzhledem ke skutečnosti, že při reakci opět vzniká kyselina chlorovodíková, je zapotřebí použití base (zpravidla terciárního aminu), abychom zabránili vzniku nereaktivní hydrochloridové soli.⁶⁹ Reakci lze urychlit přidáním katalytického množství 4-dimethylaminopyridinu (DMAP).⁷¹

Další možností, která může za některých okolností být výhodnější, je využití acylfluoridu jako aktivního meziprojektu. Za výhodu lze považovat například menší citlivost na vlhkost a zároveň vyšší reaktivitu s aminy. Pro tvorbu acylfluoridů je běžně využíváno fluoridu kyanurového,⁷² případně může být použit fluor-*N,N,N',N'*-tetramethylformamidinium hexafluorofosfát (TFFH).⁷³

V ojedinělých případech se k tvorbě amidové vazby mohou využívat i acylbromidy.⁶⁹

2.5.3.2 ACYLAZIDY

Za jednu z prvních metod tvorby amidové vazby je považován coupling za využití acylazidového meziprojektu. Acylazidy mohou být připraveny dvoukrokovou syntézou z esterů, kdy nejprve reakcí s hydrazinem vzniká acylhydrazid a v druhém kroku je přeměněn na azid pomocí kyseliny dusičné nebo alkylnitritu. Ovšem v některých případech může k vedlejší reakci dojít za vzniku isokyanátu.^{69,68}

2.5.3.3 ACYLIMIDAZOLY

Velmi využívaným couplingovým činidlem je 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI). Umožňuje jednostupňovou syntézu, kdy nejprve dochází k tvorbě aktivovaného meziprojektu *N*-acylimidazolu, který poté reaguje s příslušným aminem. Díky imidazolu, uvolňujícímu se během reakce, není třeba další base k zabránění tvorby hydrochloridové soli.^{74,69}

2.5.3.4 ANHYDRIDY

Anhydridy jsou látky, které snadno reagují s celou řadou nukleofilů, samozřejmě i s aminy. Pro reakci je možné použít jednoduché symetrické anhydridy, ale i smíšené anhydridy odvozené od isourey nebo anhydridy odvozené od kyseliny fosforečné.

Symetrické anhydridy mohou vznikat zahříváním příslušné kyseliny, nebo reakcí dvou molekul kyseliny v přítomnosti *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC). Anhydrid v dalším kroku reaguje s aminem, přičemž není nutné použít žádnou další bazi.⁶⁹

2.5.3.5 AKTIVOVANÉ ESTERY

Jednou z klasických metody přípravy amidů je esterová aminolýza. Zpravidla se používají aromatické estery, které oproti alkylesterům snáze hydrolyzují a jsou schopné reagovat s celou řadou nukleofilů díky zvýšené elektrofilitě karbonylového centra, která záleží na charakteru vybraného alkoholu. Aktivní estery mohou být připraveny reakcí s DCC nebo metodou směsných anhydridů. Nejběžněji využívané alkoholy v amidovém couplingu jsou například *p*-nitrofenol, pentafluorfenol, 2,4,5-trichlorfenol nebo *N*-hydroxysukcinimid.⁶⁸

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje, chemikálie, metody

Všechny chemikálie byly získány od společnosti Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Německo) nebo Fluorochem (Hadfield, Derbyshire, Spojené království) a byly použity bez dalšího čištění. Rozpouštědla byla zakoupena od společnosti Penta (Praha, Česká republika) nebo Merck (Německo), voda Milli-Q byla připravena pomocí purifikačního systému Millipore (Merck-Millipore, Darmstadt, Německo). Bezvodá rozpouštědla byla zakoupena od společnosti VWR (Stříbrná Skalice, Česká republika).

Průběh reakcí byl sledován na hliníkových TLC deskách Silica 60 F₂₅₄ (Merck, Německo) a pomocí TLC-MS Advion Expression CMS (Advion, Ithaca, NY, USA). Teploty tání byly měřeny na přístroji Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) metodou v otevřené kapiláře.

IČ spektra byla zaznamenána pomocí FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) pomocí metody zeslabené celkové reflektance (ATR) na germaniovém krystalu.

NMR spektra byla zaznamenána na přístroji Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) při frekvenci 500 MHz pro ¹H a 126 MHz pro ¹³C nebo Jeol JNM-ECZ600R při frekvenci 600 MHz pro ¹H a 151 MHz pro ¹³C. Chemické posuny se vztahovaly nepřímo k tetramethylsilanu prostřednictvím signálu rozpouštědla (2,50 pro ¹H a 39,7 pro ¹³C v DMSO-*d*₆, 7,25 pro ¹H a 77,19 pro ¹³C v CDCl₃-*d*₃, 2,02 pro ¹H a 29,01 pro ¹³C v acetonu-*d*₆) a uváděny v ppm (δ).

Pro čištění sloučenin byl využit flash chromatograf PuriFlash 5 (Interchim, Montluçon, Francie).

Čistota nově připravených sloučenin byla měřena pomocí přístroje Nexera® UHPLC system (Shimadzu, Kjóto, Japonsko) spojeným s PDA detektorem (SPD-M20A) na koloně Ascentis® C18 (100×3 mm, 3 μ m, Supelco®) za použití mobilní fáze acetonitril/voda v izokratickém nebo gradientovém režimu. Data byla zpracována pomocí softwaru LabSolutions (v. 5.92, Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Zásobní roztok každé sloučeniny (0,5 mg/ml) byl připraven rozpuštěním příslušného množství v methanolu. Pracovní roztoky byly připraveny zředěním zásobních roztoků směsí acetonitrilu a vody

(1:1, v/v) na hodnotu koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$. Detektor PDA zaznamenával absorpční spektra v rozsahu 190 až 380 nm, a pro hodnocení čistoty byla použita vlnová délka 254 nm.

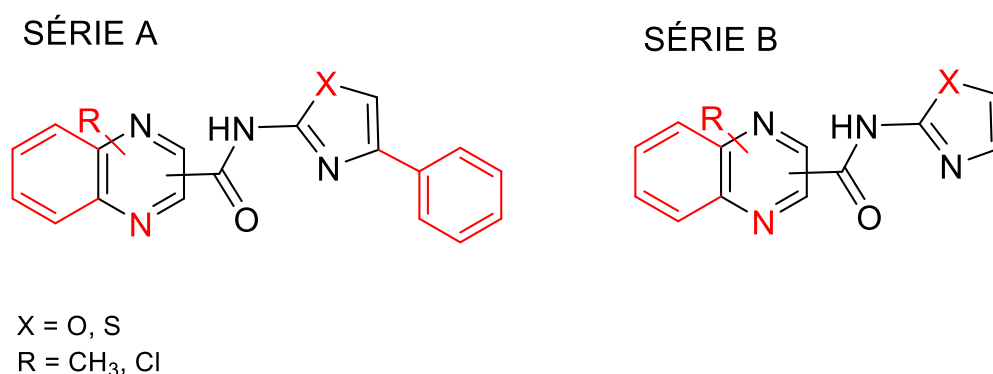
Hodnoty $\text{Log } P$ a $\text{Clog } P$ byly zjištěny pomocí programu ChemDraw Professional, verze 17.1.0.105 (PerkinElmer Informatics, Inc., Waltham, MA, USA).

Identifikace HRMS byla provedena pomocí přístroje Q-Exactive Focus (Thermo Scientific, San José, CA, USA) s HESI (Heated electrospray ionization) a data byla zpracována pomocí softwaru Xcalibur (Thermo Scientific). Rozhraní pro ionizaci vyhřívaným elektrosprejem II (HESI-II) v pozitivním iontu s následujícím nastavením: napětí spreje 0,5–5 kV; úroveň S-čočky RF +50 V; teplota kapiláry 350 °C.

Data byla získána v režimu MS s plným skenováním (FullMS) s rozlišením ($m/\Delta m$) $\approx 70\,000$ s přesností měření $\leq 2,06$ ppm s hmotnostním rozsahem kvadrupólového filtru 90–450 m/z .

3.2 Princip přípravy produktů

Sloučeniny, které jsme v rámci této práce připravovali, vznikly spojením heterocyklické karboxylové kyseliny a heterocyklického aminu pomocí amidové vazby. Pro reakci bylo využito třech základních pyridinkarboxylových kyselin (pikolinové, nikotinové a isonikotinové), jejich derivátů substituovaných methylovou skupinou nebo chlorem, případně chinoxalin-2-karboxylové kyseliny jako větší strukturní obměny. Amidy těchto kyselin vznikly reakcí s 2-aminooxazolem, 4-fenyl-2-aminooxazolem, 2-aminothiazolem, nebo 4-fenyl-2-aminothiazolem. Obecné vzorce sloučenin můžeme vidět na následujícím obrázku (Obrázek 5).



Obrázek 5: Obecné vzorce připravených sloučenin

V rámci těchto syntéz jsme připravili dvě série látek. Látky ze série A ve své struktuře obsahují 2-aminothiazol, či 2-aminooxazol substituovaný fenylem. Struktury látek ze série B obsahují výše zmíněné heterocyklické aminy bez fenylové substituce.

Pro přípravu sloučenin jsme využili dva základní reakční principy. První možností byla syntéza chloridu karboxylové kyseliny reakcí s thionylchloridem nebo oxalylchloridem. Druhou možností byl amidový coupling za pomoci CDI.

3.3 Syntéza

3.3.1 Syntéza acylchloridu

Cílem prvního kroku reakce bylo z vybrané pyridinkarboxylové kyseliny připravit acylchlorid, reaktivnější funkční derivát karboxylové kyseliny.

Obecný princip reakce vystihuje Schéma 4.

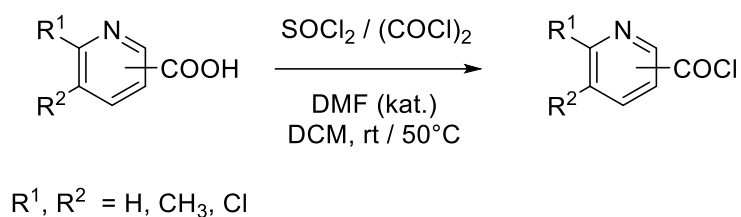
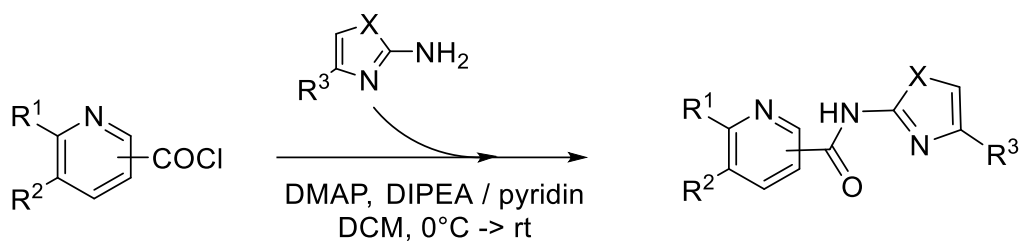


Schéma 4: Příprava chloridu pyridinkarboxylové kyseliny pomocí oxalylchloridu/thionylchloridu

Jako katalyzátor zde vystupuje DMF, jehož reakcí s oxalylchloridem/thionylchloridem vzniká meziprodukt imidoylchlorid, který je schopen dále reagovat s karboxylovou kyselinou za vzniku acylchloridu. Při reakci je uvolňován oxid uhličitý, což se projevuje vývojem bublin.

V druhém kroku (Schéma 5) probíhala reakce chloridu pyridinkarboxylové kyseliny s jedním ze čtyř heterocyklických aminů uvedených výše, za účasti DMAP jako katalyzátoru a *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) nebo pyridinu jako báze, vychytávající uvolňující se protony k zabránění změny pH reakce, která by mohla vést k vzniku nežádoucí soli heterocyklického aminu. Zároveň je nutné reakci udržovat dostatečně chlazenou, abychom předešli vzniku nežádoucího *N,N*-diacylovaného produktu.⁷⁵



X = O, S

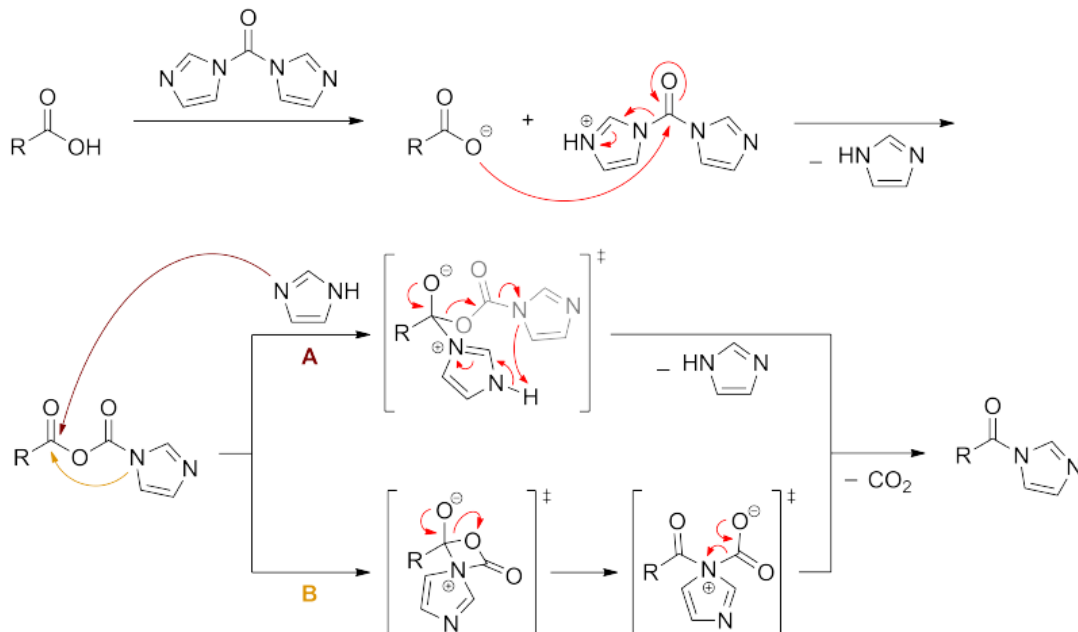
$R^1, R^2 = H, CH_3, Cl$

$R^3 = H, \text{fenyl}$

Schéma 5: Reakce chloridu pyridinkarboxylové kyseliny s aminem za účasti DMAP a DIPEA

3.3.2 Reakce s CDI

Druhou možností byla reakce, kdy pomocí 1,1'-karbonyldiimidazolu (CDI) dochází k aktivaci karboxylové kyseliny. Mechanismus aktivace můžeme vidět na následujícím obrázku (Obrázek 6).



Obrázek 6: Mechanismus aktivace karboxylové kyseliny pomocí CDI, převzato z:⁷⁶

Probíhá zde nukleofilní substituce, při níž karboxylová funkční skupina atakuje karboxylový uhlík CDI a tvoří reaktivní meziprodukt *N*-acylimidazol. Během tvorby meziproduktu je uvolňován CO₂, což se projevuje vývojem bublin. Po ukončení vývoje bublin všechny molekuly karboxylové kyseliny byly přeměněny na meziprodukt a aktivace je u konce. V druhém kroku syntézy probíhá reakce mezi *N*-acylimidazolem a aminoskupinou vybraného heterocyklického aminu za vzniku amidové vazby, přičemž dochází k uvolnění molekuly imidazolu. Pro zvýšení reaktivity bylo do reakce použito katalytické množství imidazol hydrochloridu,⁷⁷ který působí jako zdroj protonů.

3.4 Postup přípravy produktů

A) REAKCE S OXALYLCHLORIDEM

Vybraná pyridinkarboxylová kyselina (2 mmol; 1 eq) byla navážena do vysušené baňky s kulatým dnem a rozpuštěna v 10 ml bezvodého DCM. Poté byl přidán oxalylchlorid (2,2 mmol; 1,1 eq), pár kapek DMF a směs ponechána míchat za laboratorní teploty, dokud se objevuje pěna.

Do jiné baňky byl navážen příslušný amin (2,2 mmol; 1,1 eq) a rozpuštěn v 10 ml bezvodého DCM. Poté byla směs umístěna do ledu a za stálého míchání přidány DIPEA (6 mmol; 3 eq) a DMAP (10 % eq). K této směsi byl pomalu přikapáván vzniklý chlorid pyridinkarboxylové kyseliny a směs byla ponechána míchat přes noc při laboratorní teplotě.

Tento postup byl použit pro sloučeniny AB1, AB2, AB3 a AB9.

Tabulka 1: Výchozí látky použité při reakci s oxalylchloridem

	kyselina	amin
AB1	kyselina pikolinová	4-fenyl-2-aminooxazol
AB2	kyselina nikotinová	4-fenyl-2-aminooxazol
AB3	kyselina isonikotinová	4-fenyl- 2-aminooxazol
AB9	kyselina pikolinová	2-aminooxazol

B) REAKCE S THIONYLCHLORIDEM

ZA POUŽITÍ ROZPOUŠTĚDLA

Vybraná pyridinkarboxylová kyselina (2 mmol; 1 eq) byla navážena do baňky s kulatým dnem a rozpuštěna v 15 ml bezvodého toluenu. Poté byl přidán thionylchlorid (10 mmol; 5 eq), pár kapek DMF a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 110 °C přibližně hodinu. Následovalo odpaření toluenu na vakuové odparce a zbytek reakční směsi byl rozpuštěn v bezvodém DCM.

Do další baňky byl navážen amin (2,2 mmol; 1,1 eq) a rozpuštěn v 10 ml DCM. Poté byla směs umístěna do ledu a za stálého míchání přidány DIPEA (6 mmol; 3 eq) a DMAP (10 % eq). K vzniklé směsi byl pomalu přikapáván vzniklý chlorid pyridinkarboxylové kyseliny. Bylo ponecháno reagovat do druhého dne.

Postup byl použit při přípravě sloučeniny AB4.

Tabulka 2: Východí látky použité při reakci s thionylchloridem

	kyselina	amin
AB4	kyselina 5-methylpyridin-3-karboxylová	4-fenyl-2-aminoxazol

BEZ POUŽITÍ ROZPOUŠTĚDLA

Pyridinkarboxylová (případně chinoxalin-2-karboxylová) kyselina (2 mmol; 1 eq) byla navážena do baňky, k ní přidán thionylchlorid (20 mmol; 10 eq) a bylo mícháno za laboratorní teploty (případně zahřáto na cca 50–60 °C) dokud se směs nestala čirou. Poté byl thionylchlorid odpařen na vakuové odparce a zbytek reakční směsi suspendován v bezvodém DCM (1ml).

Do nové baňky byl navážen amin (2,2 mmol; 1,1 eq) a rozpuštěn ve směsi bezvodého DCM a bezvodého pyridinu (1:1). Pro některé sloučeniny byla místo pyridinu použita DIPEA (6 mmol; 3 eq.). Směs byla umístěna do ledu a za stálého míchání byl pomalu přikapáván vzniklý chlorid pyridinkarboxylové kyseliny suspendovaný v bezvodém DCM. Reakce byla ponechána míchat do druhého dne.

Tímto způsobem byla připravena většina sloučenin.

Pro AB26 jsme vycházeli ze 4 mmol pyridinkarboxylové kyseliny.

C) REAKCE S CDI

ZA POUŽITÍ ROZPOUŠTĚDLA

Pyridinkarboxylová kyselina (2 mmol; 1 eq) byla navážena do baňky s kulatým dnem a rozpuštěna v bezvodém dimethylsulfoxidu (DMSO). Potom přidáno CDI (2,2 mmol; 1,1 eq) a imidazol hydrochlorid (10 % eq). Směs byla míchána a zahřívána na 50 °C přibližně hodinu. Dále byl přidán amin (2,2 mmol; 1,1 eq) a směs byla ponechána míchat přes noc při laboratorní teplotě.

Postup byl použit pro přípravu sloučeniny AB21.

Tabulka 3: Východí látky použité při reakci s CDI (za použití rozpouštědla)

	kyselina	amin
AB21	kyselina nikotinová	4-fenyl-2-aminothiazol

AKTIVACE V PEVNÉ FÁZI

Pyridinkarboxylová kyselina (4 mmol; 1 eq) byla navážena do baňky s kulatým dnem, přidán CDI (4,4 mmol; 1,1 eq) a směs byla tavena pomocí fěnu/horkovzdušné pistole, dokud bylo pozorováno šumění (uvolňování CO₂). Poté bylo přidáno rozpouštědlo (pár ml bezvodého THF), amin (4,4 mmol; 1,1 eq) a směs byla míchána a zahřívána při 50 °C do druhého dne.

Postup byl použit pro přípravu sloučeniny AB25.

Tabulka 4: Východí látky použité při reakci s CDI (při aktivaci v pevné fázi)

	kyselina	amin
AB25	kyselina 2-chlorpyridin-4-karboxylová	2-aminothiazol

Průběh všech reakcí byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan:ethyl-acetát (2:1), výsledek reakce a vznik produktu byl ověřen pomocí TLC-MS.

3.5 Čištění sloučenin

Při čištění sloučenin byla použita rotační vakuová odparka pro zbavení se zbytků rozpouštědel a pyridinu (přidáním toluenu a odpařením). Následovalo převedení pomocí ethyl-acetátu do dělicí nálevky a vytřepání mezi ethyl-acetát a vodu, u které bylo pH upraveno na 8–9. Po oddělení fází bylo provedeno TLC pro ověření, zda ve vodné fázi nezůstaly zbytky produktu. Vytřepání bylo provedeno vždy 2–3×.

Pro zbavení se zbytků vody bylo použito třepání ethyl-acetátové fáze s nasyceným roztokem chloridu sodného, vysušení organické vrstvy nad bezvodým síranem sodným a přefiltrování přes vat. U finálního čištění byla využita flash chromatografie. Produkt byl adsorbován na silikagel, jako mobilní fáze byly použity hexan:aceton, případně hexan:ethyl-acetát a pro detekci byl zvolen UV/VIS detektor, případně detektor rozptylu světla odpařováním (ELSD). U některých produktů byla pro dočištění provedena rekrystalizace z horkého ethanolu.

Pro potvrzení čistoty produktů byla využita HPLC analýza. Konečné produkty byly charakterizovány ¹H a ¹³C NMR spektroskopií, IČ spektroskopií, teplotou tání a HRMS.

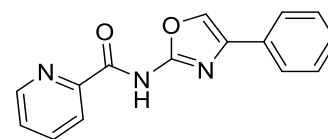
3.6 Souhrn připravených sloučenin

SÉRIE A

Systematický název: *N*-(4-fenylthiazol-2-yl)picolinamid

Označení: AB20

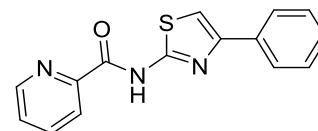
CAS: 457940-30-6



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	281,333
Log <i>P</i>	3,74
Clog <i>P</i>	3,11834
Teplota tání	127,8–130,2 °C
Teoretický výtěžek	564,4 mg
Praktický výtěžek	42,6 mg (7,55 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3347, 3116, 2925, 1684 (<i>ν</i> NHCO), 1618, 1604, 1569, 1471, 1458.
¹ H NMR	(600 MHz, CDCl ₃) δ 11.23 (s, 1H), 8.66 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.29 (dt, <i>J</i> = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 7.93 (td, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.90 – 7.85 (m, 2H), 7.53 (dd, <i>J</i> = 7.7, 4.7 Hz, 1H), 7.45 – 7.39 (m, 2H), 7.36 – 7.29 (m, 1H), 7.21 (s, 1H)
¹³ C NMR	(151 MHz, CDCl ₃) δ 162.19, 157.31, 150.63, 148.72, 147.90, 137.87, 134.53, 128.83, 128.12, 127.43, 126.21, 122.95, 108.05.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 282.0693 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 282.0696, error -0.86 ppm).

Systematický název: *N*-(4-fenyloxazol-2-yl)picolinamid

Označení: AB1



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	265,272
Log <i>P</i>	2,38
Clog <i>P</i>	2,4308
Teplota tání	106,7–109,4 °C
Teoretický výtěžek	531,1 mg
Praktický výtěžek	185,6 mg (34,94 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3351, 3165, 1708 (<i>ν</i> NHCO), 1591, 1570, 1537.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 11.56 (s, 1H), 8.76 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.16 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 8.10 (td, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.73 (dd, <i>J</i> = 7.7, 4.7 Hz, 1H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.14, 152.97, 149.01, 148.59, 139.74, 138.45, 132.70, 130.94, 129.00, 128.23, 127.92, 125.21, 123.11.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 266.0919 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 266.0924, error -1.72 ppm).

Systematický název: *N*-(4-fenylthiazol-2-yl)nikotinamid

Označení: AB21

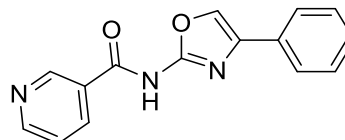
CAS: 14397-15-0



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	281,333
Log <i>P</i>	3,32
Clog <i>P</i>	2,76834
Teplota tání	228,3–230,9 °C
Teoretický výtěžek	563,1 mg
Praktický výtěžek	173,5 mg (30,81 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3107, 2927, 1677 (<i>ν</i> NHCO), 1602, 1587, 1569, 1446.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.97 (s, 1H), 9.21 (dd, <i>J</i> = 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.76 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.42 (ddd, <i>J</i> = 8.0, 2.3, 1.6 Hz, 1H), 7.94 – 7.89 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.55 (ddd, <i>J</i> = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H), 7.44 – 7.38 (m, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 1H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 164.55, 158.75, 153.47, 149.75, 136.45, 134.81, 129.31, 128.55, 128.42, 126.33, 124.12, 109.33.
HRMS	HRMS (HESI+) <i>m/z</i> = 282.0693 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 282.0696, error –1.04 ppm).

Systematický název: *N*-(4-fenyloxazol-2-yl)nikotinamid

Označení: AB2

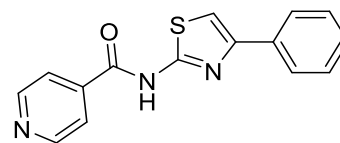


Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	265,272
Log <i>P</i>	1,95
Clog <i>P</i>	2,0808
Teplota tání	223,6 °C
Teoretický výtěžek	530,5 mg
Praktický výtěžek	65 mg (12,25 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3058, 1697 (<i>ν</i> NHCO), 1619, 1594, 1449, 1429.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 11.99 (s, 1H), 9.14 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz, 1H), 8.80 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.34 (dt, <i>J</i> = 7.9, 2.2 Hz, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.59 (dd, <i>J</i> = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.77, 153.36, 152.99, 149.10, 139.24, 135.92, 132.09, 130.73, 128.85, 128.66, 128.08, 125.01, 123.64.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 266.0921 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 266.0924, error –1.23 ppm).

Systematický název: *N*-(4-fenylthiazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB22

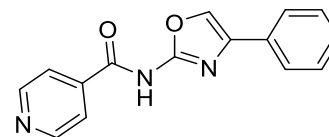
CAS: 14397-16-1



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	281,333
Log <i>P</i>	3,32
Clog <i>P</i>	2,76834
Teplota tání	207,2–208,9 °C
Teoretický výtěžek	562,6 mg
Praktický výtěžek	47,6 mg (8,46 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 2927, 1677 (<i>ν</i> NHCO), 1577, 1558, 1446, 1415.
¹ H NMR	(600 MHz, CDCl ₃) δ 11.74 (s, 1H), 8.59 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H), 7.64 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.53 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 2H), 7.27 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.24 – 7.19 (m, 2H).
¹³ C NMR	(151 MHz, CDCl ₃) δ 163.94, 159.03, 150.69, 150.50, 139.22, 133.89, 128.89, 128.40, 126.19, 121.03, 108.76
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 282.0693 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 282.0696, error –1.04 ppm).

Systematický název: *N*-(4-fenyloxazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB3

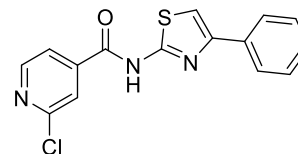


Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	265,272
Log <i>P</i>	1,95
Clog <i>P</i>	2,0808
Teplota tání	168,8–170,7 °C
Teoretický výtěžek	532,4 mg
Praktický výtěžek	171,3 mg (32,18 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3151, 1704 (<i>ν</i> NHCO), 1622, 1603, 1572, 1476, 1448.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 12.07 (s, 1H), 8.85 – 8.79 (m, 2H), 8.51 (s, 1H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.81 – 7.75 (m, 2H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 2H), 7.38 – 7.31 (m, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.72, 153.14, 150.48, 139.88, 139.32, 132.19, 130.68, 128.86, 128.11, 125.02, 121.76.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 266.0921 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 266.0924, error –1.23 ppm).

Systematický název: 2-chlor-*N*-(4-fenylthiazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB23

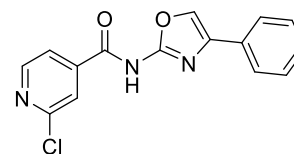
CAS: 1043211-02-4



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ OS
Molekulová hmotnost	315,775
Log <i>P</i>	4,22
Clog <i>P</i>	3,50021
Teplota tání	157,8–161,6 °C
Teoretický výtěžek	631,6 mg
Praktický výtěžek	84,2 mg (13,33 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3076, 1680 (<i>ν</i> NHCO), 1545, 1470, 1445.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 13.16 (s, 1H), 8.64 (d, <i>J</i> = 5.1 Hz, 1H), 8.15 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H), 8.00 (dd, <i>J</i> = 5.1, 1.5 Hz, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.76 (s, 1H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.03, 158.30, 151.42, 151.30, 149.77, 143.22, 134.57, 129.26, 128.43, 126.25, 123.20, 121.89, 109.62.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 316.0303 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 316.0306, error -0.86 ppm).

Systematický název: 2-chlor-*N*-(4-fenylloxazol-2-yl)isonikotinamid

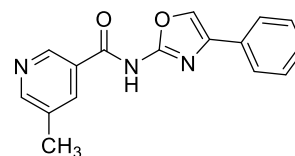
Označení: AB26



Sumární vzorec	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	299,714
Log <i>P</i>	2,86
Clog <i>P</i>	2,82732
Teplota tání	karbonizovalo při 221,9 °C
Teoretický výtěžek	1198,6 mg
Praktický výtěžek	78 mg (6,51 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3149, 1618 (<i>ν</i> NHCO), 1591, 1570, 1537.
¹ H NMR	(600 MHz, ACETON) δ 10.89 (s, 1H), 8.60 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.00 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H), 7.93 (dd, <i>J</i> = 5.0, 1.5 Hz, 1H), 7.82 – 7.73 (m, 2H), 7.40 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.32 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(151 MHz, ACETON) δ 151.88, 150.87, 128.78, 128.24, 125.33, 122.69, 121.07.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 300.0531 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 300.0534, error -1.11 ppm).

Systematický název: 5-methyl-*N*-(4-fenyloxazol-2-yl)nikotinamid

Označení: AB4

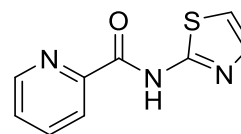


Sumární vzorec	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	279,299
Log <i>P</i>	2,44
Clog <i>P</i>	2,5798
Teplota tání	258,6 °C
Teoretický výtěžek	560,7 mg
Praktický výtěžek	60 mg (10,71 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 2926, 1691 (νNHCO), 1615, 1592, 1516, 1489.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 11.90 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.88, 153.30, 146.26, 139.26, 136.09, 133.08, 132.05, 130.73, 128.84, 128.22, 128.06, 125.00, 17.75.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 280.1077 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 280.1080, error -1.17 ppm).

SÉRIE B

Systematický název: *N*-(thiazol-2-yl)picolinamid

Označení: AB17

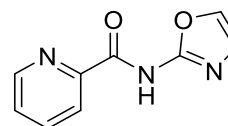


CAS: 301208-58-2

Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	205,235
Log <i>P</i>	1,65
Clog <i>P</i>	1,02034
Teplota tání	143,2–145,3 °C
Teoretický výtěžek	410,4 mg
Praktický výtěžek	138,1 mg (33,65 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3182, 1675 (<i>ν</i> NHCO), 1524, 1489, 1472, 1451, 1417.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 12.00 (s, 1H), 8.76 (ddd, <i>J</i> = 4.7, 1.7, 1.1 Hz, 1H), 8.18 (dt, <i>J</i> = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 8.10 (td, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.71 (ddd, <i>J</i> = 7.7, 4.7, 1.1 Hz, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.35 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 162.76, 157.53, 149.16, 148.15, 138.47, 138.32, 127.90, 123.13, 114.64.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 206.0381 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 206.0383, error -0.74 ppm).

Systematický název: *N*-(oxazol-2-yl)picolinamid

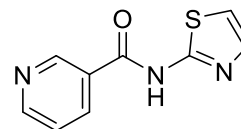
Označení: AB9



Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	189,174
Log <i>P</i>	0,28
Clog <i>P</i>	0,3328
Teplota tání	128,6–131,2 °C
Teoretický výtěžek	379,7 mg
Praktický výtěžek	223 mg (58,73 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3136, 1696 (<i>ν</i> NHCO), 1585, 1476, 1459, 1429.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 11.41 (s, 1H), 8.74 (ddd, <i>J</i> = 4.7, 1.7, 1.1 Hz, 1H), 8.13 (dt, <i>J</i> = 7.7, 1.1 Hz, 1H), 8.08 (td, <i>J</i> = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.99 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H), 7.71 (ddd, <i>J</i> = 7.7, 4.7, 1.1 Hz, 1H), 7.20 (d, <i>J</i> = 1.1 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 162.93, 152.54, 148.75, 148.44, 138.20, 137.29, 127.63, 127.13, 122.84.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 190.0608 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 190.0611, error -1.51 ppm).

Systematický název: *N*-(thiazol-2-yl)nikotinamid

Označení: AB18

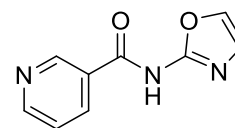


CAS: 14397-12-7

Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	205,235
Log <i>P</i>	1,22
Clog <i>P</i>	0,67034
Teplota tání	195,3–197,0 °C
Teoretický výtěžek	411,3 mg
Praktický výtěžek	269,7 mg (65,57 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3151, 2929, 1661 (<i>ν</i> NHCO), 1599, 1579, 1565, 1472, 1436.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 12.88 (s, 1H), 9.20 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.78 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.41 (dt, <i>J</i> = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 7.64 – 7.53 (m, 2H), 7.31 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 164.21, 158.97, 153.01, 149.35, 137.47, 136.05, 128.45, 123.76, 114.24.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 206.0380 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 206.0383, error –1.03 ppm).

Systematický název: *N*-(oxazol-2-yl)nikotinamid

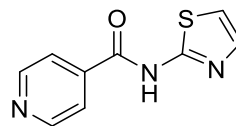
Označení: AB10



Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	189,174
Log <i>P</i>	-0,14
Clog <i>P</i>	-0,0171999
Teplota tání	154,8–159,7 °C
Teoretický výtěžek	378,9 mg
Praktický výtěžek	39,2 mg (10,35 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3151, 3110, 1706 (<i>ν</i> NHCO), 1625, 1591, 1498, 1417.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 11.88 (s, 1H), 9.12 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.77 (dd, <i>J</i> = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.32 (dt, <i>J</i> = 7.9, 2.1 Hz, 1H), 7.94 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.56 (dd, <i>J</i> = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 152.73, 149.16, 135.87, 123.55.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 190.0609 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 190.0611, error –0.88 ppm).

Systematický název: *N*-(thiazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB19

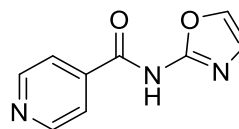


CAS: 14397-13-8

Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ OS
Molekulová hmotnost	205,235
Log <i>P</i>	1,22
Clog <i>P</i>	0,67034
Teplota tání	193,6–195,3 °C
Teoretický výtěžek	410,6 mg
Praktický výtěžek	307 mg (74,77 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3186, 2952, 1683 (<i>ν</i> NHCO), 1549, 1490, 1435, 1414.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.93 (s, 1H), 8.79 – 8.73 (m, 2H), 7.96 – 7.92 (m, 2H), 7.56 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.29 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 164.64, 159.35, 150.94, 140.09, 137.72, 122.33, 114.77.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 206.0381 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 206.0383, error –0.69 ppm).

Systematický název: *N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB11

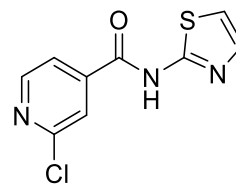


Sumární vzorec	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	189,174
Log <i>P</i>	-0,14
Clog <i>P</i>	-0,0171999
Teplota tání	175,1–177,5 °C
Teoretický výtěžek	380 mg
Praktický výtěžek	182 mg (47, 89 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3158, 3127, 2933, 1618 (<i>ν</i> NHCO), 1591, 1570, 1537.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 12.03 (s, 1H), 8.82 – 8.71 (m, 2H), 7.95 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.91 – 7.85 (m, 2H), 7.24 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 150.36, 140.73, 136.09, 121.83.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 190.0609 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 190.0611, error –1.24 ppm).

Systematický název: 2-chlor-*N*-(thiazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB25

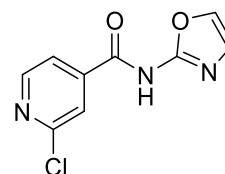
CAS: 1019457-08-9



Sumární vzorec	C ₉ H ₆ ClN ₃ OS
Molekulová hmotnost	239,677
Log <i>P</i>	2,12
Clog <i>P</i>	1,40221
Teplota tání	152,4–154,0 °C
Teoretický výtěžek	958,7 mg
Praktický výtěžek	265,3 mg (27,67 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3077, 1592 (<i>ν</i> NHCO), 1527, 1477, 1460, 1423.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 13.06 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.96 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.33 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 163.60, 159.89, 151.38, 151.27, 143.91, 136.87, 123.15, 121.89, 114.71.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 239.9990 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 239.9993, error –1.33 ppm).

Systematický název: 2-chlor-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB15

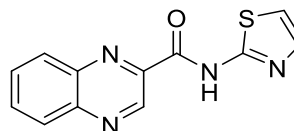


Sumární vzorec	C ₉ H ₆ ClN ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	223,616
Log <i>P</i>	0,76
Clog <i>P</i>	0,729316
Teplota tání	158,3–161, 7 °C
Teoretický výtěžek	447,2 mg
Praktický výtěžek	111,3 mg (24,89 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3205, 1615 (<i>ν</i> NHCO), 1591, 1576, 1541, 1463.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.24 (s, 1H), 8.60 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 1.3 Hz, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.89 (dd, <i>J</i> = 5.0, 1.3 Hz, 1H), 7.27 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 150.89, 150.77, 122.68, 121.51.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 224.0217 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 224.0221, error –1.71 ppm).

Systematický název: *N*-(thiazol-2-yl)chinoxalin-2-karboxamid

Označení: AB28

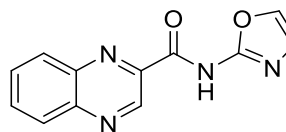
CAS: 871561-02-3



Sumární vzorec	C ₁₂ H ₈ N ₄ OS
Molekulová hmotnost	256,283
Log <i>P</i>	2,15
Clog <i>P</i>	1,66975
Teplota tání	251,4 °C
Teoretický výtěžek	512,1 mg
Praktický výtěžek	112 mg (21,87 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 2941, 1663 (<i>ν</i> NHCO), 1538, 1490.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.57 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.24 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.02 – 7.94 (m, 2H), 7.59 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.36 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 162.85, 158.21, 144.43, 143.83, 143.66, 140.40, 138.47, 133.06, 132.03, 130.32, 129.62, 115.18.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 257.0488 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 257.0492, error –1.52 ppm).

Systematický název: *N*-(oxazol-2-yl)chinoxalin-2-karboxamid

Označení: AB14

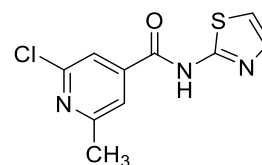


Sumární vzorec	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₂
Molekulová hmotnost	240,222
Log <i>P</i>	0,79
Clog <i>P</i>	0,99686
Teplota tání	162,8–165,3 °C
Teoretický výtěžek	480,6 mg
Praktický výtěžek	89,3 mg (18,58 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3161, 2927, 1688 (<i>ν</i> NHCO), 1623, 1482, 1415.
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO) δ 11.86 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.29 – 8.24 (m, 1H), 8.24 – 8.20 (m, 1H), 8.06 – 7.99 (m, 3H), 7.26 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H).
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO) δ 162.37, 152.43, 143.90, 143.39, 143.13, 139.72, 137.37, 132.50, 131.51, 129.68, 129.11, 127.21.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 241.0715 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 241.0720, error –2.06 ppm).

Systematický název: 2-chlor-6-methyl-*N*-(thiazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB27

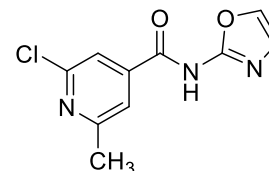
CAS: 1565518-90-2



Sumární vzorec	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ OS
Molekulová hmotnost	253,704
Log <i>P</i>	2,83
Clog <i>P</i>	1,90121
Teplota tání	198,6 °C
Teoretický výtěžek	507,5 mg
Praktický výtěžek	133 mg (26,21 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3072, 2925, 1673 (<i>ν</i> NHCO), 1543, 1489, 1386, 1325.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.93 (s, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 7.29 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 163.73, 160.74, 150.49, 144.06, 121.34, 120.09, 114.78, 24.21.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 254.0144 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 254.0149, error -1.85 ppm).

Systematický název: 2-chlor-6-methyl-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid

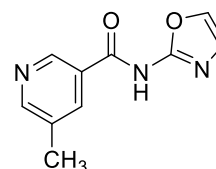
Označení: AB13



Sumární vzorec	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	237,643
Log <i>P</i>	1,46
Clog <i>P</i>	1,22832
Teplota tání	148,5–153,2 °C
Teoretický výtěžek	475,1 mg
Praktický výtěžek	60 mg (12,63 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3263, 3107, 2926, 1593 (<i>ν</i> NHCO), 1544, 1400, 1356.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 12.11 (s, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.25 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 160.18, 149.88, 135.58, 120.85, 119.58, 23.62.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 238.0374 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 238.0378, error -1.74 ppm).

Systematický název: 5-methyl-*N*-(oxazol-2-yl)nikotinamid

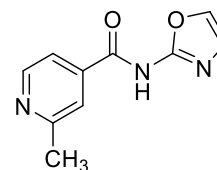
Označení: AB24



Sumární vzorec	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	203,201
Log <i>P</i>	0,34
Clog <i>P</i>	0,4818
Teplota tání	171,0–174,7 °C
Teoretický výtěžek	406,3 mg
Praktický výtěžek	45,3 mg (11,15 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3157, 3136, 2929, 1715 (<i>ν</i> NHCO), 1625, 1436, 1416, 1301.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 11.73 (s, 1H), 8.89 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, 1H), 8.58 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 8.19 – 8.04 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.17 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 153.63, 146.91, 133.51, 129.27, 18.26.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 204.0765 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 204.0767, error –1.01 ppm).

Systematický název: 2-methyl-*N*-(oxazol-2-yl)isonikotinamid

Označení: AB12



Sumární vzorec	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₂
Molekulová hmotnost	203,201
Log <i>P</i>	0,56
Clog <i>P</i>	0,4818
Teplota tání	148,8–151,6 °C
Teoretický výtěžek	407,5 mg
Praktický výtěžek	290,9 mg (71,39 %)
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹) 3157, 3128, 1716 (<i>ν</i> NHCO), 1622, 1602, 1423, 1410, 1298.
¹ H NMR	(600 MHz, DMSO) δ 11.79 (s, 1H), 8.63 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.75 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 7.66 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H).
¹³ C NMR	(151 MHz, DMSO) δ 158.90, 149.68, 121.14, 118.89, 24.06.
HRMS	(HESI+) <i>m/z</i> = 204.0765 (teoreticky pro M+H ⁺ <i>m/z</i> = 204.0767, error –1.06 ppm).

3.7 Biologické hodnocení sloučenin

3.7.1 Antimykobakteriální aktivita

3.7.1.1 Antimykobakteriální aktivita proti Mtb H37Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. avium*, *M. kansasii*

Testování na antimykobakteriální aktivitu bylo provedeno s rychle rostoucími *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607), *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) a některými atypickými mykobakteriemi, konkrétně se jednalo o *Mycobacterium avium* DSM 44156 (ATCC 25291), *Mycobacterium kansasii* DSM 44162 (ATCC 12478) z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo) a s avirulentním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) z Belgických koordinovaných sbírek mikroorganismů (Antverpy, Belgie).

Antimykobakteriální aktivita byla stanovena pomocí mikrodiluční metody s využitím 96jamkové mikrotitrační destičky. Jako kultivační médium byl použit bujón Middlebrook 7H9 (Merck, Darmstadt, Německo) obohacený o 0,4% glycerol (Merck, Darmstadt, Německo) a 10% růstový doplněk Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie). Kmeny mykobakterií byly kultivovány na obohaceném Middlebrook 7H9 agaru a suspenze byly připraveny v obohaceném Middlebrook 7H9 bujónu. Konečná hustota byla upravena na hodnotu 1,0 podle McFarlandovy stupnice a zředěna bujónem v poměru 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie) nebo 1:10 (pro ostatní mykobakterie).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich), poté byl přidán bujón Middlebrook 7H9, aby se dosáhlo koncentrace 2000 µg/ml. Při stanovení aktivity byly jako standardy použity isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CIP) (Merck). Konečných koncentrací bylo dosaženo binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze, kdy výsledné koncentrace byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 µg/ml. Konečná koncentrace DMSO v žádné jamce nepřesáhla 2,5% (v/v) a neovlivnila růst mykobakterií. Byly zahrnuty pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) i negativní (bujón, DMSO) kontroly růstu.

Destičky byly uzavřeny polyesterovou lepicí fólií a inkubovány ve tmě při 37 °C bez míchání. Pro *M. smegmatis* po 48 hodinách inkubace následoval přídavek 0,01% roztoku resazurinu sodné soli, pro *M. aurum* přídavek následoval po 72 hodinách inkubace,

pro *M. avium* a *M. kansasii* po 96 hodinách inkubace a pro Mtb H37Ra po 120 hodinách inkubace. Poté byly mikrotitrační destičky inkubovány ještě další 2,5 hodiny pro stanovení aktivity proti *M. smegmatis*, 4 hodiny pro *M. aurum*, 5–6 hodin pro *M. avium* a *M. kansasii*, a 18 hodin pro Mtb H37Ra.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) v $\mu\text{g/ml}$ a byla stanovena na základě změny zbarvení, přičemž modré zbarvení značilo, že testovaná sloučenina v dané koncentraci vykazuje aktivitu (nebyl pozorován růst mykobakterií) a růžové zbarvení značilo, že testovaná sloučenina v dané koncentraci antimykobakteriální aktivitu nevykazuje. MIC (v $\mu\text{g/ml}$) byla stanovena jako nejnižší koncentrace, která zabránila změně modré barvy na růžovou. Experimentální stanovení bylo provedeno vždy ve dvou opakováních.

3.7.1.2 Antimykobakteriální aktivita proti Mtb H37Rv a MDR kmenům

Byla použita mikrodiluční metoda založena na mikrotitračním testu s Alamarovou modří. Testovaný kmen Mtb H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294) byl získán z České národní sbírky typových kultur (CNCTC) Státního zdravotního ústavu (Praha, Česká republika). Multirezistentní kmeny Mtb s laboratorním identifikačním označením IZAK a MATI byly získány z Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové od MUDr. Pavly Paterové, PhD. Mtb s laboratorním označením IZAK, bylo izolováno od 63letého muže z bronchiálního aspirátu v roce 2020, testováno a interpretováno podle breakpointů CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) v roce 2020. Mtb s laboratorním označením MATI, bylo izolováno od 23letého muže ze sputa v roce 2021, testováno a interpretováno podle breakpointů CLSI v roce 2021. U obou kmenů byla zaznamenána citlivost pouze na ethambutol (EMB).

Ke kultivaci byl použit bujón Middlebrook 7H9 deklarovaného pH 6,6 (Sigma-Aldrich) obohacený o 0,4% glycerol (Sigma-Aldrich) a 10% růstový doplněk OADC (Himedia, Mumbai, Indie).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny, zředěny v DMSO a smíchány s bujónem (25 μl roztoku DMSO v 2,475 ml bujónu) a 100 μl bylo umístěno do jamek mikrotitračních destiček. Mykobakteriální inokula byla suspendována v izotonickém solném roztoku a hustota byla upravena na 0,5-1,0 podle McFarlandovy stupnice. Tyto suspenze byly naředěny 10^{-1} a použity k inokulaci testovacích jamek, přičemž do každé jamky bylo

přidáno 100 µl mykobakteriální suspenze. Konečné koncentrace testovaných sloučenin v jamkách byly 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 a 1,56 µg/ml. Jako standard byl použit INH. Pozitivní kontrola (viditelný růst) sestávala z bujónu, mykobakteriální suspenze a DMSO. Po pěti dnech inkubace bylo přidáno celkem 30 µl pracovního roztoku Alamarové modři (směs 0,02% resazurinové sodné soli (aq. sol.) a 10% Tween 80 v poměru 1:1). Výsledky byly poté stanoveny po 24 hodinách inkubace. MIC (v µg/ml) byla stanovena jako nejnižší koncentrace, která zabránila změně modré barvy na růžovou. Všechny experimenty byly prováděny ve dvou opakováních.

3.7.2 Antibakteriální aktivita

Mikrodiluční bujónová metoda byla provedena podle pokynů EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) s drobnými úpravami. Osm testovaných bakteriálních kmenů (čtyři G+ a čtyři G-) bylo zakoupeno z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) nebo z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSM, Braunschweig, Německo): *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 4223 (ATCC 29213), meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA) CCM 4750 (ATCC 43300), *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (ATCC 29212), *Escherichia coli* CCM 3954 (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* CCM 4415 (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* DSM 30007 (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853). Kultivace probíhala v kationtově upraveném Mueller-Hintonově bujónu (CAMHB, M-H 2 Broth, Merck, Darmstadt, Německo) při teplotě 35 ± 2 °C.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Merck), aby vznikly zásobní roztoky. Konečná koncentrace DMSO v kultivačním médiu nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila růst bakterií. Pozitivní kontroly růstu se skládaly výhradně z testovaných mikrobů, zatímco negativní kontroly růstu se skládaly z kultivačního média a DMSO. Antibakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) v µM po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a vlhkém prostředí při teplotě 35 ± 2 °C. Pro hodnocení koncového bodu MIC byla použita vizuální kontrola a indikátor metabolické aktivity, Alamar Blue (AlamarBlue™ Cell Viability reagent, ThermoFisher Scientific, USA). Do testů byly zapojeny interní standardy kvality gentamicinu a ciprofloxacinu (oba od společnosti Merck). MIC standardů viz Tabulka 5. Všechny experimenty byly prováděny v duplikátech.

Tabulka 5: Hodnoty MIC standardů (ciprofloxacin, gentamicin) v μM

kmen	ciprofloxacin (μM)	gentamicin (μM)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,773	2,094
MRSA	0,386	> 16,750
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,773	0,131
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,090	> 16,750
<i>Escherichia coli</i>	0,024	2,094
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,193	1,047
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,545	16,750
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,545	1,047

3.7.3 Antifungální aktivita

Hodnocení antifungální aktivity bylo provedeno mikrodiluční bujónovou metodou. Pro tyto účely bylo použito celkem osm kmenů hub (čtyři kvasinky a čtyři plísně), a to: *Candida albicans* CCM 8320 (ATCC 24433), *Candida krusei* CCM 8271 (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* CCM 8260 (ATCC 22019), *Candida tropicalis* CCM 8264 (ATCC 750), *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Lichtheimia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* CCM 8377 (ATCC 9533). Testované kmeny byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) nebo z Americké sbírky typových kultur (ATCC, Manassas, VA, USA).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a dvojnásobně zředěny médiem RPMI 1640 s glutaminem a 2% glukózou, pufovaným na pH 7,0 pomocí MOPS (kyselina 3-morfolinopropan-1-sulfonová). Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku. Inkubace probíhala ve tmě a ve vlhkém prostředí při teplotě 35 ± 2 °C po dobu 24 a 48 hodin (72 a 120 hodin pro *Trichophyton interdigitale*). Pozitivní růstové kontroly se skládaly výhradně z testovaného mikroba, zatímco negativní růstové kontroly se skládaly z kultivačního média a DMSO. Pro vyhodnocení koncového bodu MIC byla použita vizuální kontrola a indikátor metabolické aktivity, Alamar Blue (ThermoFisher Scientific, USA). Jako standardy byly

použity amfotericin B (Merck) a vorikonazol (Toronto Research Chemicals, CA). MIC standardů viz Tabulka 6. Všechny experimenty byly prováděny v duplikátech.

Tabulka 6: Hodnoty MIC standardů (amfotericin B, vorikonazol) v μM

kmen	amfotericin B (μM)	vorikonazol (μM)
<i>Candida albicans</i>	1,082	> 45,806
<i>Candida krusei</i>	1,082	> 45,806
<i>Candida parapsilosis</i>	0,541	> 45,806
<i>Candida tropicalis</i>	1,082	> 45,806
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,329	2,863
<i>Aspergillus flavus</i>	4,329	> 45,806
<i>Lichtheimia corymbifera</i>	1,082	> 45,806
<i>Trichophyton interdigitale</i>	1,082	> 45,806

3.7.4 Cytotoxicita

Pro testování cytotoxicity sloučenin byla využita buněčná linie lidského hepatocelulárního jaterního karcinomu HepG2 zakoupená z Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK). Byla kultivována v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose) (Sigma-Aldrich, USA) doplněném 10% fetálním hovězím sérem (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), 1% roztokem L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a roztokem neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich) ve zvlhčené atmosféře s 5% obsahem CO_2 při 37 °C. Pro subkultivaci byly buňky sklizeny po ošetření trypsinem/EDTA (Sigma-Aldrich) při 37 °C. Pro hodnocení cytotoxicity byly jako experimentální skupiny použity buňky ošetřené testovanými látkami. Neošetřené buňky HepG2 sloužily jako kontrolní skupiny.

Buňky byly 24 hodin před experimentem nasazeny do 96jamkové destičky v hustotě 10 000 buněk na jamku. Následující den byly buňky ošetřeny každou z testovaných látek rozpuštěnou v DMSO. Testované látky byly připraveny v různých inkubačních koncentracích (1–1000 μM) v trojkombinacích podle jejich rozpustnosti. Současně byly v trojkombinacích připraveny kontroly představující 100% životaschopnost buněk, 0% životaschopnost buněk (buňky ošetřené 10% DMSO), kontrolu bez buněk a kontrolu vehikula. Po 24hodinové inkubaci ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO_2 při 37 °C

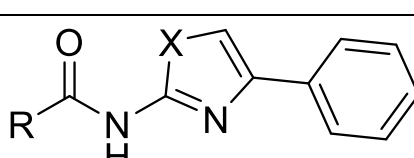
bylo přidáno činidlo ze soupravy CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96, PROMEGA, Fitchburg, WI, USA). Po dvou hodinách inkubace při 37 °C byla zaznamenána absorbance vzorků při 490 nm (TECAN, Infinita M200, Rakousko). Standardní toxikologický parametr IC₅₀ byl vypočten nelineární regresí ze semilogaritmického grafu inkubační koncentrace versus procento absorbance vzhledem k neošetřeným kontrolám pomocí softwaru GraphPad Prism 9, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 Výsledky a diskuze

V rámci této práce se podařilo připravit 23 sloučenin – 9 sloučenin strukturního typu A, a 14 sloučenin strukturního typu B – z nichž tři sloučeniny (AB17, AB18 a AB19) byly již dříve připraveny a testovány na inhibiční aktivitu proti bakteriální MetAP.³²

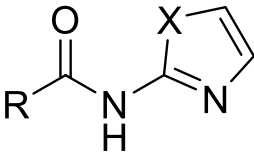
Praktické výtěžky se pohybovaly v rozmezí od 7 % do 75 % výtěžku teoretického. Pro potvrzení čistoty byla využita HPLC analýza a finální sloučeniny byly charakterizovány ¹H a ¹³C NMR spektroskopií, IČ spektroskopií, teplotou tání a HRMS (hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením).

Tabulka 7: Výsledky antimykobakteriálního testování a cytotoxicity – série A.

SÉRIE A								
								
SLOUČENINY			MIC (μg/mL)					IC ₅₀ (μM)
KÓD	R	X	<i>Mtb</i> H37Ra	<i>M.</i> <i>avium</i>	<i>M.</i> <i>kans.</i>	<i>M.</i> <i>smeg.</i>	<i>M.</i> <i>aurum</i>	HepG2
AB20	pyridin-2-yl	S	3,91	≥500	3,91	≥500	≥500	>100
AB1	pyridin-2-yl	O	3,91	31,25	3,91	125	31,25	883,4
AB21	pyridin-3-yl	S	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	>25
AB2	pyridin-3-yl	O	125	n.a.	n.a.	500	250	610,3
AB22	pyridin-4-yl	S	7,81	≥500	7,81	≥ 500	≥500	>100
AB3	pyridin-4-yl	O	31,25	n.a.	n.a.	125	31,25	879,3
AB23	2-Cl-pyridin-4-yl	S	3,91	15,625	<3,91	15,625	31,25	102,6
AB26	2-Cl-pyridin-4-yl	O	7,81	15,625	15,625	31,25	7,81	136,1
AB4	5-Me-pyridin-3-yl	O	≥250	≥250	≥250	≥250	≥250	>100

n.a. – data nejsou k dispozici (not available)

Tabulka 8: Výsledky antimykobakteriálního testování a cytotoxicity – série B.

SÉRIE B								
								
SLOUČENINY			MIC (µg/mL)					IC ₅₀ (µM)
KÓD	R	X	<i>Mtb</i> H37Ra	<i>M.</i> <i>avium</i>	<i>M.</i> <i>kans.</i>	<i>M.</i> <i>smeg.</i>	<i>M.</i> <i>aurum</i>	HepG2
AB17	pyridin-2-yl	S	31,25	n.a.	n.a.	62,5	7,81	>1000
AB9	pyridin-2-yl	O	62,5	n.a.	n.a.	125	31,25	>1000
AB18	pyridin-3-yl	S	250	n.a.	n.a.	≥500	250	>1000
AB10	pyridin-3-yl	O	31,25	n.a.	n.a.	62,5	15,625	>1000
AB19	pyridin-4-yl	S	250	≥500	250	≥500	≥500	>1000
AB11	pyridin-4-yl	O	15,625	n.a.	n.a.	62,5	15,625	>1000
AB25	2-Cl-pyridin-4-yl	S	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	>250
AB15	2-Cl-pyridin-4-yl	O	3,125	3,125	3,125	6,25	3,125	664,1
AB28	chinoxalin-2-yl	S	≥250	≥250	7,81	≥250	≥250	>50
AB14	chinoxalin-2-yl	O	15,625	n.a.	n.a.	62,5	15,625	>1000
AB27	2-Cl-6-Me- pyridin-4-yl	S	≥500	≥500	≥500	≥500	≥500	>250
AB13	2-Cl-6-Me- pyridin-4-yl	O	< 3,91	3,91	7,81	7,81	3,91	959,4
AB24	5-Me-pyridin-3-yl	O	7,81	125	62,5	≥500	31,25	>1000
AB12	2-Me-pyridin-4-yl	O	3,91	62,5	31,25	250	15,625	>1000

n.a. – data nejsou k dispozici (not available)

Tabulka 9: Hodnoty MIC standardů

	MIC (µg/mL)				
	<i>Mtb H37Ra</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kans.</i>	<i>M. smeg.</i>	<i>M. aurum</i>
CIP	0,25	0,25–0,5	0,25	0,125	0,015625
INH	0,25	1000	3,125–6,25	15,625–31,25	3,91
RIF	0,003–0,0015	0,0625–0,03125	0,025	12,5	0,39

CIP – ciprofloxacin, INH – isoniazid, RIF – rifampicin

V tabulkách (Tabulka 7 a Tabulka 8) můžeme vidět, že většina sloučenin prokázala určitou antimykobakteriální aktivitu. Některé sloučeniny vykazovaly dokonce široké spektrum účinku a byly aktivní proti všem testovaným mykobakteriálním kmenům.

Z 23 připravených sloučenin jich 9 ukázalo aktivitu $\leq 7,81$ µg/mL proti klinicky významnému kmenu *Mtb H37Ra*, kdy tato hodnota odráží ještě poměrně dobrou aktivitu.

U sloučenin série A se aktivita mezi oxazolovými a thiazolovými deriváty výrazně nelišila. Například u sloučenin AB20 a AB1 byly naměřeny stejné hodnoty MIC (3,91 µg/mL). V rámci dvojice derivátů AB22 a AB3 se jako aktivnější jevil thiazolový derivát, což ale mohlo být způsobeno chybou metody. U série B lze pozorovat výrazné zvýšení aktivity při náhradě thiazolu oxazolem, kdy příkladem nám může být jedna z neaktivnějších sloučenin – AB15 (MIC <3,91 µg/mL) a její neaktivní thiazolový analog – AB25 (MIC ≥ 500 µg/mL). Ve většině případů tedy zavedení 2-AMO vedlo ke změně neúčinných derivátů na účinné. Není ovšem jasné, zdali k tomuto jevu docházelo na základě lepšího průniku membránami v důsledku zlepšení fyzikálně-chemických vlastností, nebo se na tom podílela interakce se specifickým cílem.

Sloučeniny s pyridinovým jádrem se obecně zdají aktivnější než sloučeniny s chinoxalinovým jádrem, ačkoliv v rámci této práce nebylo připraveno dostatek sloučenin pro vyvození jednoznačného závěru. Nižší aktivita by mohla být způsobena nižší rozpustností ve vodě a zhoršenou penetrací v porovnání s ostatními sloučeninami. Rozšíření série o sloučeniny obsahující další typy (hetero)aromatických jader a stanovení podrobnějšího vztahu struktury a účinku z toho vyplývajícího, je součástí článku publikovaného Juhásem a kol.⁵¹

Při srovnání pyridinových derivátů mezi sebou vyplývá, že neaktivnější sloučeniny jsou deriváty kyseliny pikolinové a isonikotinové, tedy sloučeniny s dusíkovým heteroatomem v poloze 2 nebo v poloze 4 proti karboxamidové skupině.

Příkladem nám mohou být sloučeniny AB20, AB1, AB23 nebo AB26 u kterých bylo dosaženo MIC v rozmezí 3,91–7,81 $\mu\text{g/ml}$. Dusík v poloze 3 oproti karboxamidu zpravidla aktivitu snižoval (př. AB1 vs AB2).

V rámci substituce pyridinového jádra byly zkoumány účinky substituentů jako je methylová skupina či chlor. Obecně se jako nejvhodnější ukázala substituce v poloze 3 oproti karboxamidovému linkeru. 2-Cl deriváty vykazovaly lepší aktivitu než jejich nesubstituovaná analoga (př. AB22 vs AB23) a obdobně tomu bylo u 2-Me derivátů (př. AB11 vs AB12). Tento trend byl patrný u sloučenin obou sérií a byl pozorován u thiazolových i oxazolových derivátů.

Sloučeniny s nejvyšší aktivitou proti Mtb H37Ra a nejširším spektrem účinku (AB13 a AB15) byly testovány také na aktivitu proti virulentnímu kmenu Mtb (H37Rv) a multirezistentním klinickým izolátům (MDR), rezistentním vůči streptomycinu, téměř všem léčivům první linie (isoniazidu, rifampicinu, pyrazinamidu) a citlivým pouze na ethambutol.

Tabulka 10: Antimykobakteriální aktivita sloučenin proti Mtb H37Rv a multirezistentním klinickým izolátům

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Mtb H37Rv	Mtb IZAK	Mtb MATI
AB13	6,25	3,13	3,13
AB15	6,25	3,13	3,13
CIP	0,2 S	0,2 S	0,2 S
INH	0,39 S	12,5 R	12,5 R
EMB	0,39 S	1,56 S	1,56 S

S – senzitivní, R – rezistentní

U testovaných sloučenin byla pozorována velmi dobrá aktivita proti všem třem kmenům (viz. Tabulka 10). Aktivita proti těmto kmenům byla srovnatelná s aktivitami proti Mtb H37Ra (viz Tabulka 7 a Tabulka 8).

Cytotoxicita připravených sloučenin byla stanovena pomocí parametru IC_{50} . Hodnoty lze nalézt v tabulkách (Tabulka 7 a Tabulka 8). Většina sloučenin nevykazovala výraznou cytotoxicitu ($\text{IC}_{50} > 1000 \text{ M}$), přičemž ani při nejvyšších testovaných koncentracích nebylo dosaženo významného snížení životaschopnosti buněk. U některých sloučenin nebylo možné hodnoty IC_{50} stanovit, kvůli snížené rozpustnosti a následnému vysrážení

v inkubačním médiu. Ovšem všechny sloučeniny, kterých se tento problém týkal, nevykazovaly významnou cytotoxicitu až do své nejvyšší testované koncentrace. Hodnoty IC₅₀ sloučenin AB23 a AB26 naznačují určitý stupeň cytotoxicity, nicméně index selektivity (SI), uveden v tabulce (Tabulka 11), je u většiny sloučenin vyšší než 10, což poukazuje na přiměřenou selektivitu sloučenin vůči mykobakteriím a umožňuje jejich zařazení do další optimalizace. Rozdíl v cytotoxicitě thiazolových a oxazolových derivátů nebyl pozorován.

Tabulka 11: Cytotoxicita a index selektivity sloučenin s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou

Sloučenina	HepG2 IC ₅₀	MIC _{H37Ra} (µg/mL)	MIC _{H37Ra} (µM)	SI*
AB24	>1000	7,81	38,4	>26,0
AB12	>1000	3,91	19,2	>52,0
AB15	664,1	3,125	14,0	47,5
AB13	959,4	<3,91	<16,5	>58,3
AB20	>100	3,91	13,9	>7,2
AB1	>1000	3,91	14,7	>67,8
AB22	>100	7,81	27,8	>3,6
AB23	102,6	3,91	12,4	8,3
AB26	136,1	7,81	26,1	5,2

* SI = IC₅₀ (µM) / MIC (µM)

Některé sloučeniny aktivní proti mykobakteriím vykazovaly také aktivitu proti některým kmenům bakterií a hub, ovšem aktivita těchto sloučenin byla výrazně slabší. Nejlepší hodnoty MIC se pohybovaly od 31,25 µM do 62,5 µM.

Aktivitu proti G⁺ bakteriím ukázaly sloučeniny AB2, AB26 a AB13 a AB15. U sloučeniny AB15 bylo zaznamenáno širší spektrum účinku, zahrnující aktivitu proti *MRSA*, *Staphylococcus epidermidis*, i proti G⁻ bakteriím jako *Escherichia coli* a *Acinetobacter baumannii*. Aktivita proti kmenům hub byla pozorována u sloučenin AB15 (proti *Candida albicans* a *Lichtheimia corymbifera*) a AB1 (proti *Trichophyton interdigitale*). Ostatní sloučeniny nevykazovaly v testovaných koncentracích antibakteriální ani antifungální aktivitu (MIC se pohybovala nad nejvyšší testovanou koncentrací), viz Tabulka 12 a Tabulka 13.

Tabulka 12: Výsledky antibakteriálního testování derivátů

MIC (μM)								
Kód	SA	MRSA	SE	EF	EC	KP	AB	PA
SÉRIE A								
AB20	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB1	500	500	125	>500	>500	>500	>500	>500
AB21	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB2	500	>500	62,5	>500	>500	>500	>500	>500
AB22	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB3	500	>500	125	>500	>500	>500	>500	>500
AB23	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB26	62,5	62,5	250	250	>500	500	500	>500
AB4	250	250	250	>250	>250	>250	>250	>250
SÉRIE B								
AB17	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB9	125	250	125	>500	>500	>500	>500	>500
AB18	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB10	250	500	500	>500	>500	>500	>500	>500
AB19	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB11	250	500	500	>500	>500	>500	>500	>500
AB25	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB15	250	62,5	62,5	500	62,5	125	62,5	>500
AB28	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB14	500	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500
AB27	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB13	62,5	125	125	500	250	125	500	>500
AB24	500	500	500	>500	>500	500	500	>500
AB12	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

SA - *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, SE - *Staphylococcus epidermidis*, EF - *Enterococcus faecalis*, EC - *Escherichia coli*, KP - *Klebsiella pneumoniae*, AB - *Acinetobacter baumannii*, PA - *Pseudomonas aeruginosa*

Tabulka 13: Výsledky antifungálního testování derivátů

MIC (µM)								
Kód	CA	CK	CP	CT	AF	AFla	LC	TI
SÉRIE A								
AB20	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB1	500	500	500	500	500	500	125	62,5
AB21	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB2	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB22	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB3	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB23	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB26	500	500	500	500	>500	>500	>500	500
AB4	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SÉRIE B								
AB17	>500	500	500	>500	500	>500	>500	500
AB9	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB18	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB10	500	500	250	>500	>500	>500	>500	125
AB19	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB11	500	500	>500	>500	>500	>500	500	500
AB25	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB15	31,25	250	250	500	125	500	62,5	125
AB28	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB14	500	250	500	500	500	>500	500	250
AB27	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
AB13	125	500	500	>500	250	>500	125	125
AB24	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AB12	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125

CA - *Candida albicans*, CK - *Candida krusei*, CP - *Candida parapsilosis*, CT - *Candida tropicalis*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AFla - *Aspergillus flavus*, LC - *Lichtheimia corymbifera*, TI - *Trichophyton interdigitale*

Přestože oxazolové deriváty AB13, AB15, AB26 měly slabší aktivitu proti bakteriím a houbám oproti mykobakteriím, obecně vykazují širokospektré účinky. Thiazolová analoga těchto sloučenin byla proti bakteriím a houbám neaktivní. Vzhledem k tomu, že při testování nebyly zaznamenány problémy s rozpustností sloučenin, lze usuzovat, že rozdíl v aktivitě oxazolových a thiazolových derivátů by mohl být způsoben lepšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi oxazolů, díky kterým pravděpodobně dochází k lepšímu průniku mikrobiálními membránami.

U několika reprezentativních dvojic izosterních sloučenin byla hodnocena rozpustnost ve vodě kinetickou metodou založenou na vodou indukovaném vysrážení zásobních roztoků DMSO. Lepší rozpustnost (až 59× u sloučeniny AB26 oproti AB23) byla pozorována u 2-aminooxazolových derivátů, nicméně nebyl získán dostatek dat pro vyvození jednoznačného závěru. Kompletní výsledky jsou dostupné v publikaci.⁵¹

5 Závěr

V rámci diplomové práce bylo připraveno 23 sloučenin kombinujících fragment pyridinkarboxylové kyseliny a 2-aminothiazolu či 2-aminoxazolu. Z připravených sloučenin tři byly již v minulosti publikované.

Byla identifikována řada sloučenin obsahující 2-aminoxazolový fragment, které jsou vysoce účinné proti mykobakteriálním kmenům (včetně multirezistentních). Tyto sloučeniny měly stejnou nebo dokonce vyšší aktivitu než jejich 2-aminothiazolové izostery.

Zaznamenali jsme, že záměna síry za kyslík sama o sobě nestačí k navození antimikrobní aktivity u jinak neaktivních sloučenin, avšak předpokládáme, že změna fyzikálně-chemických vlastností, která tuto záměnu provází, přispívá k zvýšení aktivity již aktivních sloučenin, např. zlepšením prostupnosti přes membrány. Toto zvýšení aktivity bylo patrnější u série sloučenin obsahujících ve své struktuře 2-aminothiazol/2-aminoxazol bez fenylové substituce.

Z výsledků antimykobakteriálních testů byly interpretovány další vztahy struktury a účinku. Vyšší aktivitu měly sloučeniny obsahující pyridinové jádro, kdy pyridinový dusík se nachází v poloze 2 nebo v poloze 4 oproti karboxamidovému linkeru. Zkoumán byl také vliv substituentů, kdy vyšší aktivitu ukázaly 2-Cl a 2-Me deriváty.

Několik derivátů vykazovalo široké spektrum aktivity napříč testovanými mikroorganismy (zahrnující i bakterie a houby). Většina sloučenin neprojevila významnou cytotoxicitu.

Výsledky prezentované v této diplomové práci jsou významnou součástí publikovaného článku.⁵¹

6 Seznam použité literatury

- (1) *Global tuberculosis report 2021* [online]. World Health Organization: Geneva, 2022. [cit. 2022-06-26]. URL<<https://apps.who.int/iris/handle/10665/356584>>.
- (2) Homolka, J. *Tuberkulóza, 5.*, upravené vydání.; Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum: Praha, 2016. ISBN 978-80-246-3521-7
- (3) Schindler, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů, 2.*, doplněné a přepracované vydání.; Grada: Praha, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2
- (4) Bednář, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie, 1.*; Marvil: Praha, 1996. ISBN 978-80-238-0297-9
- (5) Mladěnka, P. *Tuberkulóza a její léčba, přednáška.* Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018
- (6) Dheda, K.; Barry, C. E.; Maartens, G. Tuberculosis. *The Lancet* **2016**, *387* (10024), 1211–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00151-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00151-8).
- (7) Wallenfels, J. Epidemiologie tuberkulózy. *Kardiol Rev Int Med* **2019** (3), 4.
- (8) 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>.
- (9) *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2020* [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [cit. 2022-07-28]. URL<<https://www.uzis.cz/res/f/008358/tbc2020-cz.pdf>>.
- (10) 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>.
- (11) Nguyen, L. Antibiotic Resistance Mechanisms in M. Tuberculosis: An Update. *Arch Toxicol* **2016**, *90* (7), 1585–1604. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1727-6>.
- (12) Tabarsi, P.; Mardani, M. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: A Review Article. *Arch Clin Infect Dis* **2012**, *7* (3), 81–84. <https://doi.org/10.5812/archcid.14773>.
- (13) Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5* (9), a017863. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017863>.
- (14) *WHO announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis* [online]. World Health Organization, 2021, [cit. 2022-08-26]. URL<<https://www.who.int/news/item/27-01-2021-who-announces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>>.
- (15) Culyba, M. J.; Mo, C. Y.; Kohli, R. M. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry* **2015**, *54* (23), 3573–3582. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00109>.
- (16) von Wintersdorff, C. J. H.; Penders, J.; van Niekerk, J. M.; Mills, N. D.; Majumder, S.; van Alphen, L. B.; Savelkoul, P. H. M.; Wolffs, P. F. G. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- (17) Farouk Elsadek, M.; Mohamed Ahmed, B.; Fawzi Farahat, M. An Overview on Synthetic 2-Aminothiazole-Based Compounds Associated with Four Biological Activities. *Molecules* **2021**, *26* (5), 1449. <https://doi.org/10.3390/molecules26051449>.

- (18) Zitko, J.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Navrátilová, L.; Kuneš, J.; Vinšová, J.; Doležal, M. Design, Synthesis and Antimycobacterial Activity of Hybrid Molecules Combining Pyrazinamide with a 4-Phenylthiazol-2-Amine Scaffold. *Med. Chem. Commun.* **2018**, *9* (4), 685–696. <https://doi.org/10.1039/C8MD00056E>.
- (19) Morales-Bonilla, P.; Pérez-Cardena, A.; Quintero-Mármol, E.; Arias-Téllez, J. L.; Mena-Rejón, G. J. Preparation, Antimicrobial Activity, and Toxicity of 2-Amino-4-Arylthiazole Derivatives. *Heteroat. Chem.* **2006**, *17* (4), 254–260. <https://doi.org/10.1002/hc.20182>.
- (20) Li, J.-R.; Li, D.-D.; Wang, R.-R.; Sun, J.; Dong, J.-J.; Du, Q.-R.; Fang, F.; Zhang, W.-M.; Zhu, H.-L. Design and Synthesis of Thiazole Derivatives as Potent FabH Inhibitors with Antibacterial Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.020>.
- (21) Tahir, T.; Ashfaq, M.; Saleem, M.; Rafiq, M.; Shahzad, M. I.; Kotwica-Mojzzych, K.; Mojzzych, M. Pyridine Scaffolds, Phenols and Derivatives of Azo Moiety: Current Therapeutic Perspectives. *Molecules* **2021**, *26* (16), 4872. <https://doi.org/10.3390/molecules26164872>.
- (22) Ananthan, S.; Faaleolea, E. R.; Goldman, R. C.; Hobrath, J. V.; Kwong, C. D.; Laughon, B. E.; Maddry, J. A.; Mehta, A.; Rasmussen, L.; Reynolds, R. C.; Secrist, J. A.; Shindo, N.; Showe, D. N.; Sosa, M. I.; Suling, W. J.; White, E. L. High-Throughput Screening for Inhibitors of Mycobacterium Tuberculosis H37Rv. *Tuberculosis* **2009**, *89* (5), 334–353. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.05.008>.
- (23) Meissner, A.; Boshoff, H. I.; Vasani, M.; Duckworth, B. P.; Barry, C. E.; Aldrich, C. C. Structure–Activity Relationships of 2-Aminothiazoles Effective against Mycobacterium Tuberculosis. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6385–6397. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.08.048>.
- (24) Mjambili, F.; Njoroge, M.; Naran, K.; De Kock, C.; Smith, P. J.; Mizrahi, V.; Warner, D.; Chibale, K. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aminothiazole Derivatives as Antimycobacterial and Antiplasmodial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (2), 560–564. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.022>.
- (25) Kesicki, E. A.; Bailey, M. A.; Ovechkina, Y.; Early, J. V.; Alling, T.; Bowman, J.; Zuniga, E. S.; Dalai, S.; Kumar, N.; Masquelin, T.; Hipskind, P. A.; Odingo, J. O.; Parish, T. Synthesis and Evaluation of the 2-Aminothiazoles as Anti-Tubercular Agents. *PLoS One* **2016**, *11* (5), e0155209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155209>.
- (26) Luo, Q.-L.; Li, J.-Y.; Liu, Z.-Y.; Chen, L.-L.; Li, J.; Qian, Z.; Shen, Q.; Li, Y.; Lushington, G. H.; Ye, Q.-Z.; Nan, F.-J. Discovery and Structural Modification of Inhibitors of Methionine Aminopeptidases from Escherichia Coli and Saccharomyces Cerevisiae. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (13), 2631–2640. <https://doi.org/10.1021/jm0300532>.
- (27) Juhás, M.; Pallabothula, V. S. K.; Grabrijan, K.; Šimovičová, M.; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Bárta, P.; Paterová, P.; Gobec, S.; Sosič, I.; Zitko, J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Substituted 3-Amino-N-(Thiazol-2-Yl)Pyrazine-2-Carboxamides as Inhibitors of Mycobacterial Methionine Aminopeptidase I. *Bioorg. Chem.* **2022**, *118*, 105489. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105489>.
- (28) Bhatt, A.; Molle, V.; Besra, G. S.; Jacobs Jr, W. R.; Kremer, L. The Mycobacterium Tuberculosis FAS-II Condensing Enzymes: Their Role in Mycolic Acid Biosynthesis, Acid-Fastness, Pathogenesis and in Future Drug Development.

- Mol. Microbiol.* **2007**, *64* (6), 1442–1454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05761.x>.
- (29) Lai, C.-Y.; Cronan, J. E. β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Is Essential for Bacterial Fatty Acid Synthesis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (51), 51494–51503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308638200>.
- (30) Nofiani, R.; Philmus, B.; Nindita, Y.; Mahmud, T. 3-Ketoacyl-ACP Synthase (KAS) III Homologues and Their Roles in Natural Product Biosynthesis. *Med. Chem. Commun.* **2019**, *10* (9), 1517–1530. <https://doi.org/10.1039/C9MD00162J>.
- (31) Bernier, S. G.; Taghizadeh, N.; Thompson, C. D.; Westlin, W. F.; Hannig, G. Methionine Aminopeptidases Type I and Type II Are Essential to Control Cell Proliferation. *J. Cell. Biochem.* **2005**, *95* (6), 1191–1203. <https://doi.org/10.1002/jcb.20493>.
- (32) Luo, Q.-L.; Li, J.-Y.; Liu, Z.-Y.; Chen, L.-L.; Li, J.; Ye, Q.-Z.; Nan, F.-J. Inhibitors of Type I MetAPs Containing Pyridine-2-Carboxylic Acid Thiazol-2-Ylamide. Part 1: SAR Studies on the Determination of the Key Scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (3), 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.11.034>.
- (33) Olaleye, O.; Raghunand, T. R.; Bhat, S.; He, J.; Tyagi, S.; Lamichhane, G.; Gu, P.; Zhou, J.; Zhang, Y.; Grosset, J.; Bishai, W. R.; Liu, J. O. Methionine Aminopeptidases from Mycobacterium Tuberculosis as Novel Antimycobacterial Targets. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (1), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.12.014>.
- (34) Frija, L. M. T.; Pombeiro, A. J. L.; Kopylovich, M. N. Coordination Chemistry of Thiazoles, Isothiazoles and Thiadiazoles. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *308*, 32–55. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.10.003>.
- (35) Raper, E. S. Copper Complexes of Heterocyclic Thioamides and Related Ligands. *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *129* (1), 91–156. [https://doi.org/10.1016/0010-8545\(94\)85019-4](https://doi.org/10.1016/0010-8545(94)85019-4).
- (36) Eilbeck, W. J.; Holmes, F.; Underhill, A. E. Cobalt(II), Nickel(II), and Copper(II) Complexes of Imidazole and Thiazole. *J. Chem. Soc., A* **1967**, 757. <https://doi.org/10.1039/j19670000757>.
- (37) Weaver, J. A.; Hambright, P.; Talbert, P. T.; Kang, E.; Thorpe, A. N. Complexes of Thiazoles. I. Zinc(II), Cobalt(II), Copper(II), Nickel(II), and Platinum(II) Derivatives of Alkyl-Substituted Thiazoles. *Inorg. Chem.* **1970**, *9* (2), 268–273. <https://doi.org/10.1021/ic50084a017>.
- (38) Pichko, V. A.; Garnovskii, D. A.; Burlov, A. S.; Garnovskii, A. D. Quantum-Chemical Interpretation of Regioselective Coordination in the Series of 2-Aminoazole-Metal Complexes. *Russ Chem Bull* **1995**, *44* (12), 2274–2276. <https://doi.org/10.1007/BF00713592>.
- (39) Abdulhadi, S. L.; Abdulkadir, M. Q.; Al-Mudhafar, M. M. The Importance of 2-AminoThiazole Schiff Bases as Antimicrobial and Anticancer Agents. *MJS* **2020**, *31* (3), 46–64. <https://doi.org/10.23851/mjs.v31i3.865>.
- (40) Devine, S. M.; Mulcair, M. D.; Debono, C. O.; Leung, E. W. W.; Nissink, J. W. M.; Lim, S. S.; Chandrashekar, I. R.; Vazirani, M.; Mohanty, B.; Simpson, J. S.; Baell, J. B.; Scammells, P. J.; Norton, R. S.; Scanlon, M. J. Promiscuous 2-Aminothiazoles (PrATs): A Frequent Hitting Scaffold. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (3), 1205–1214. <https://doi.org/10.1021/jm501402x>.
- (41) Baell, J. B.; Holloway, G. A. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their

- Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2719–2740.
<https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
- (42) Baell, J. B.; Nissink, J. W. M. Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS Chem Biol* **2018**, *13* (1), 36–44. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00903>.
- (43) Baell, J. B.; Ferrins, L.; Falk, H.; Nikolakopoulos, G.; Baell, J. B.; Ferrins, L.; Falk, H.; Nikolakopoulos, G. PAINS: Relevance to Tool Compound Discovery and Fragment-Based Screening. *Aust. J. Chem.* **2013**, *66* (12), 1483–1494.
<https://doi.org/10.1071/CH13551>.
- (44) Jaladanki, C. K.; Khatun, S.; Gohlke, H.; Bharatam, P. V. Reactive Metabolites from Thiazole-Containing Drugs: Quantum Chemical Insights into Biotransformation and Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2021**, *34* (6), 1503–1517.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00450>.
- (45) Smith, G. F. Designing Drugs to Avoid Toxicity. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Lawton, G., Witty, D. R., Eds.; Elsevier, 2011; Vol. 50, pp 1–47.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381290-2.00001-X>.
- (46) Di, L.; Fish, P. V.; Mano, T. Bridging Solubility between Drug Discovery and Development. *Drug Discovery Today* **2012**, *17* (9), 486–495.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.11.007>.
- (47) Ram, V. J.; Sethi, A.; Nath, M.; Pratap, R. *The Chemistry of Heterocycles: Nomenclature and Chemistry of Three- to Five-Membered Heterocycles*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands ; Cambridge, MA, United States, 2019.
- (48) Kashyap, S. J.; Garg, V. K.; Sharma, P. K.; Kumar, N.; Dudhe, R.; Gupta, J. K. Thiazoles: Having Diverse Biological Activities. *Med Chem Res* **2012**, *21* (8), 2123–2132. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9685-2>.
- (49) Wiley, R. H. The Chemistry of the Oxazoles. *Chem. Rev.* **1945**, *37* (3), 401–442.
<https://doi.org/10.1021/cr60118a002>.
- (50) Azzali, E.; Girardini, M.; Annunziato, G.; Pavone, M.; Vacondio, F.; Mori, G.; Pasca, M. R.; Costantino, G.; Pieroni, M. 2-Aminooxazole as a Novel Privileged Scaffold in Antitubercular Medicinal Chemistry. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (7), 1435–1441. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00173>.
- (51) Juhás, M.; Bachtíková, A.; Nawrot, D. E.; Hatoková, P.; Pallabothula, V. S. K.; Diepoltová, A.; Jand'ourek, O.; Bárta, P.; Konečná, K.; Paterová, P.; Šesták, V.; Zitko, J. Improving Antimicrobial Activity and Physico-Chemical Properties by Isosteric Replacement of 2-Aminothiazole with 2-Aminooxazole. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (5), 580. <https://doi.org/10.3390/ph15050580>.
- (52) Borcea, A.-M.; Ionuț, I.; Crișan, O.; Oniga, O. An Overview of the Synthesis and Antimicrobial, Antiprotozoal, and Antitumor Activity of Thiazole and Bisthiazole Derivatives. *Molecules* **2021**, *26* (3), 624.
<https://doi.org/10.3390/molecules26030624>.
- (53) Kearney, P. C.; Fernandez, M.; Flygare, J. A. Solid-Phase Synthesis of 2-Aminothiazoles. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (1), 196–200.
<https://doi.org/10.1021/jo971542a>.
- (54) Hantzsch, A.; Weber, J. H. Ueber Verbindungen Des Thiazols (Pyridins Der Thiophenreihe). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20* (2), 3118–3132.
<https://doi.org/10.1002/cber.188702002200>.
- (55) Kodomari, M.; Aoyama, T.; Suzuki, Y. One-Pot Synthesis of 2-Aminothiazoles Using Supported Reagents. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (9), 1717–1720.
[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00084-9).

- (56) Yasnitskii, B. G.; Dol'berg, E. B. Mechanism of the Formation of 2-Aminothiazole in the Reaction of Chloroacetaldehyde with Thiourea. *Chem Heterocycl Compd* **1971**, 7 (7), 866–868. <https://doi.org/10.1007/BF00475713>.
- (57) Li, X.; Sun, B.; Wei, J.; Wang, X.; Zhao, L.; Zang, C.; Zi, Y.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Gao, M. (JINAN ENLIGHTEN CHEMICAL TECHNOLOGY CO., LTD.): *Synthetic Method for 2-Acetyl Thiazole*. PCT Int. Appl. CN105348216A
- (58) Safari, J.; Sadeghi, M. Nanostarch: A Novel and Green Catalyst for Synthesis of 2-Aminothiazoles. *Monatsh Chem* **2017**, 148 (4), 745–749. <https://doi.org/10.1007/s00706-016-1805-8>.
- (59) Safari, J.; Sadeghi, M. Montmorillonite K10: An Effective Catalyst for Synthesis of 2-Aminothiazoles. *Res Chem Intermed* **2016**, 42 (12), 8175–8183. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2587-7>.
- (60) Wasserman, H. H.; Vinick, F. J. Mechanism of the Robinson-Gabriel Synthesis of Oxazoles. *J. Org. Chem.* **1973**, 38 (13), 2407–2408. <https://doi.org/10.1021/jo00953a028>.
- (61) Palmer, D. C. *Oxazoles: Synthesis, Reactions, and Spectroscopy*; Wiley: Hoboken, N.J., 2003. ISBN 978-0-471-42803-9
- (62) *Robinson–Gabriel synthesis* [on-line]. Wikimedia Foundation, Inc., 2022, [cit. 2022-08- 28]. URL< https://en.wikipedia.org/wiki/Robinson%E2%80%93Gabriel_synthesis#/media/File:Robinson-Gabriel-Synthese-Mechanismus.svg>
- (63) Cockerill, A. F.; Deacon, A.; Harrison, R. G.; Osborne, D. J.; Prime, D. M.; Ross, W. J.; Todd, A.; Verge, J. P. An Improved Synthesis of 2-Amino-1,3-Oxazoles under Basic Catalysis. *Synthesis* **1976**, 1976 (09), 591–593. <https://doi.org/10.1055/s-1976-24127>.
- (64) Lapierre, J.-M.; Namdev, N. D.; Ashwell, M. a; France, D. S.; Wu, H.; Hutchins, P. M.; Tandon, M.; Liu, Y.; Link, J. S.; Ali, S. M.; Brassard, C. J.; Nicewonger, R. B.; Filikov, A.; Carazza, R. J. *Raf Inhibitors and Their Uses*. PCT Int. Appl. WO2007123892A2
- (65) Allen, C. L.; Williams, J. M. J. Metal-Catalysed Approaches to Amide Bond Formation. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (7), 3405–3415. <https://doi.org/10.1039/C0CS00196A>.
- (66) Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. A Simple Preparation of Amides from Acids and Amines by Heating of Their Mixture. *Synth. Commun.* **1993**, 23 (19), 2761–2770. <https://doi.org/10.1080/00397919308013807>.
- (67) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/B701677H>.
- (68) Joullie, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of Amide Bond Formation. *Arkivoc* **2010**, 2010 (8), 189–250. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0011.816>.
- (69) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.
- (70) Brückner, R. *Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms*; Advanced organic chemistry series; Harcourt/Academic Press: San Diego, 2002.
- (71) Ragnarsson, U.; Grehn, L. Novel Amine Chemistry Based on DMAP-Catalyzed Acylation. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31 (8), 494–501. <https://doi.org/10.1021/ar980001k>.

- (72) Olah, G.; Nojima, M.; Kerekes, I. Synthetic Methods and Reactions; IV. ¹ Fluorination of Carboxylic Acids with Cyanuric Fluoride. *Synthesis* **2002**, 1973 (08), 487–488. <https://doi.org/10.1055/s-1973-22238>.
- (73) Carpino, L. A.; El-Faham, A. Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphate: A Rapid-Acting Peptide Coupling Reagent for Solution and Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (19), 5401–5402. <https://doi.org/10.1021/ja00124a040>.
- (74) Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82 (17), 4596–4600. <https://doi.org/10.1021/ja01502a038>.
- (75) Wamhoff, H.; Kroth, E. Dihalogenetriphenylphosphoranes in the Synthesis of Heterocycles .29. a Simple Synthesis of Pteridin-4-Ones, from Methyl 3-Amino-2-Pyrazinecarboxylate and Pyrazino[3,1]oxazin-4-Ones. *Synthesis* **1994**, No. 4, 405–410.
- (76) *Carbonyldiimidazole* [on-line]. Wikimedia Foundation, Inc., 2022, [cit. 2022-08-30]. URL<<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Carbonyldiimidazole&oldid=1094160873>>.
- (77) Woodman, E. K.; Chaffey, J. G. K.; Hopes, P. A.; Hose, D. R. J.; Gilday, J. P. N,N'-Carbonyldiimidazole-Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole·HCl. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, 13 (1), 106–113. <https://doi.org/10.1021/op800226b>.