

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

**SYNTÉZA A HODNOCENÍ ANTIMYKOBAKTERIÁLNĚ AKTIVNÍCH
DERIVÁTŮ 1,3,4-OXADIAZOLU**

ENIKŮ ŠIKOROVÁ

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Václav Pflégr

HRADEC KRÁLOVÉ 2022

„Čestne prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom a všetky myšlienky, dáta a ich zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala, riadne citujem. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

POĎAKOVANIE

Moja srdečná vďaka patrí môjmu školiteľovi doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za jeho ochotu, odborné vedenie a cenné rady počas vypracovania tejto diplomovej práce. Ďalej by som chcela z celého srdca poďakovať môjmu konzultantovi Mgr. Václavovi Pflégrovi za jeho čas a trpezlivosť, neustálu podporu a jeho prínosné rady. Ďakujem taktiež aj celému kolektívu Katedry organickej a bioorganickej chémie za vytvorenie príjemného pracovného prostredia a priateľský prístup. Za vykonanie hodnotenia antimykobakteriálnej aktivity ďakujem RNDr. Jiřine Stolařikovej, rovnako ako ďakujem RNDr. Jane Maixnerovej, Ph.D., za stanovenie cytotoxicity.

Táto práca bola podporená projektom Grantovej agentúry Českej republiky č. 20-19638Y.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Autor práce: Enikó Šikorová

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Václav Pflégr

Názov diplomovej práce: Syntéza a hodnotenie antimykobakteriálne aktívnych derivátů 1,3,4-oxadiazolu

Tuberkulóza (TBC) je závažné infekčné ochorenie spôsobené obligátne patogénnymi kmeňmi *Mycobacterium tuberculosis complex* (*Mtb.*) a dodnes patrí medzi desať najčastejších príčin úmrtí na celom svete. Jednou z hlavných komplikácií liečby TBC je stále narastajúca rezistencia mykobakteriálnych kmeňov voči používaným liečivám. Preto je vývoj nových antimykobakteriálnych zlúčenín kľúčový pre prekonanie tohto problému.

Výskum a vývoj nových potenciálnych antimykobakteriálnych látok sa často zaoberá modifikáciami klinicky používaných liečiv – veľakrát sa jedná o liečivo prvej línie, izoniazid (INH). Aj východiskom tejto práce je práve štruktúra už spomínaného INH.

Najprv bola pripravená a hodnotená séria 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov a *N*^c-acylizonikotinohydrazidov ako ich syntetických prekurzorov s veľmi sľubnou aktivitou (vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia – MIC) proti niekoľkým mykobakteriálnym kmeňom (MIC *Mtb.* H₃₇Rv 1–8 μM). Najaktívnejšie zlúčeniny boli ďalej testované proti vybraným multiliekovo a extenzívne liekovo rezistentným (MDR a XDR) kmeňom *Mtb.* (MIC 4–8 μM). Nebola zaznamenaná žiadna skrížená rezistencia s klinicky používanými antituberkulotikami. Zlúčeniny pochádzajúce z týchto sérií ďalej nevykazovali žiadnu signifikantnú *in vitro* toxicitu voči bunkám línie HepG2 v použítom koncentračnom rozsahu.

Na základe predchádzajúcich výsledkov bola pripravená a hodnotená ďalšia séria modifikovaných 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov a ich prekurzorov. Predmetom modifikácie bolo heterocyklické jadro (zámena izonikotinohydrazidu za izoméry nikotinohydrazidu či pikolinohydrazidu) alebo alkylový reťazec (jeho rôzne vetvenie, zavedenie dvojnej väzby). Tieto zlúčeniny vykazovali v niektorých prípadoch veľmi

sľubné aktivity, ktoré boli lepšie než u pôvodnej série zlúčenín (MIC pre *Mtb.* H₃₇Rv 0,5–4 µM; MIC pre *M. kansasii* 6509/96 1–8 µM).

Asymetrické 1,2-diacylhydrazíny, ako prekurzory k vyššie uvedeným derivátom, boli pripravené dvomi metódami. Prvá metóda spočívala v reakcii INH s vhodným acylchloridom (komerčne dostupným alebo pripraveným na pracovisku) v prítomnosti uhličitanu draselného ako bázy s použitím bezvodého tetrahydrofuránu ako rozpúšťadla. Druhá metóda bola založená na karbodiimidovom C-N couplingu za použitia *N*-(3-dimetylaminopropyl)-*N'*-etyl-karbodiimid hydrochloridu a 1-hydroxybenzotriazol hydrátu ako katalyzátoru. Všetky pripravené 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoly sa získali priamo dehydratívnou cyklizáciou prekurzorových 1,2-diacylhydrazínov. Tá prebiehala reakciou s *p*-toluénsulfonylchloridom a trietylamínom v dichlórmetáne ako rozpúšťadle.

Kľúčové slová

N'-acylheteroarylhydrazidy; 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoly; antimykobakteriálna rezistencia; cytotoxicita; *in vitro* antimykobakteriálna aktivita; izoniazid; 1,3,4-oxadiazol; tuberkulóza

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Enikő Šikorová

Supervisor: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Consultant: Mgr. Václav Pflégr

Title of diploma thesis: Synthesis and evaluation of antimycobacterial 1,3,4-oxadiazole derivatives

Tuberculosis (TB) is a serious infectious disease caused by obligately pathogenic rods of *Mycobacterium tuberculosis* complex (*Mtb.*), and it is still among the ten most common causes of death worldwide. One of the main complications of TB therapy is the ever-increasing resistance of mycobacterial strains to conventional drugs. Therefore, the development of new antimycobacterial compounds is crucial to overcome this issue.

Research and development of new potential antimycobacterial agents often involve structure modifications of clinically used drugs – frequently the first-line drug, isoniazid (INH). The starting point of this work is also the structure of the already mentioned INH.

First, a series of 2-alkyl-5-(pyridine-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles and *N*'-acylisonicotinohydrazides as their synthetic precursors were prepared and evaluated with very promising activity (expressed as minimal inhibitory concentration – MIC) against several mycobacterial strains (MIC *Mtb.* H₃₇Rv of 1-8 μM). Furthermore, the most active compounds were tested against selected multidrug- and extensively drug-resistant strains of *Mtb.* (MDR- and XDR-TB) with MIC values of 4-8 μM. No cross-resistance with clinically used antituberculosis agents has been reported. Compounds from these series did not show any significant *in vitro* toxicity against HepG2 cell line in the used concentration range.

Based on our previous findings, another series of modified 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoles and their precursors were prepared and evaluated. The modification concerned the heterocyclic core (replacing the isonicotinohydrazide with an isomeric nicotinohydrazide or picolinohydrazide) or the alkyl chain (its different branching, introduction of a double bond). These compounds showed in some cases very promising activities that were better than the original series of compounds (MIC *Mtb.* H₃₇Rv of 0.5-4 μM; MIC *M. kansasii* 6509/96 of 1-8 μM).

Asymmetric 1,2-diacylhydrazines, as precursors to the abovementioned derivatives, were prepared by two various synthetic routes. The first method was based on the reaction of INH with the appropriate acyl chloride (commercially available or in-house prepared) in the presence of potassium carbonate as a base, using anhydrous tetrahydrofuran as a solvent. The second synthetic way was based on carbodiimide C-N coupling using *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride and 1-hydroxybenzotriazole hydrate as a catalyst. All of the prepared 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoles were obtained directly by dehydrative cyclization of 1,2-diacylhydrazines. This was carried out by reaction with *p*-toluenesulfonyl chloride and triethylamine in dichloromethane as a solvent.

Key words

N'-acylheteroarylhydrazides; 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoles; antimycobacterial resistance; cytotoxicity; *in vitro* antimycobacterial activity; isoniazid; 1,3,4-oxadiazole; tuberculosis

OBSAH

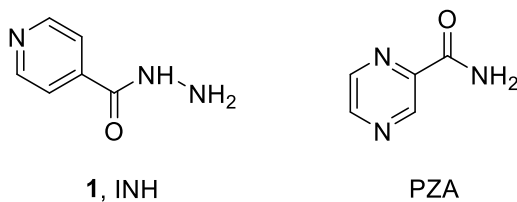
1	ÚVOD	13
2	TEORETICKÁ ČASŤ	14
2.1	NOVÉ ANTITUBERKULOTIKÁ	14
2.2	OXADIAZOLOVÝ FRAGMENT	16
2.2.1	Krátky prehľad derivátov 1,3,4-oxadiazolu s antimykobakteriálnou aktivitou.....	18
2.3	FUNKČNÉ SKUPINY SPÁJAJÚCE ALKYL S 1,3,4-OXADIAZOLOM	21
2.3.1	Alkylované deriváty 5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu.....	21
2.3.2	4-(5-Substituované-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridíny.....	22
2.3.3	Alkylované deriváty 5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-tiolu.....	23
3	CIELE PRÁCE	25
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
4.1	CHEMICKÁ ČASŤ	26
4.1.1	Obecná metodika.....	26
4.1.2	Syntéza a charakterizácia zlúčenín.....	27
4.2	BIOLOGICKÁ AKTIVITA	42
4.2.1	Hodnotenie antimykobakteriálnej aktivity.....	42
4.2.2	Hodnotenie cytotoxicity.....	47
5	DISKUSIA	49
5.1	CHÉMIA	49
5.1.1	Syntéza <i>N</i> ^c -acylizonikotinohydrazidov.....	50
5.1.2	Syntéza modifikovaných <i>N</i> ^c -acylheteroarylhydrazidov.....	51
5.1.3	Syntéza 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov.....	51
5.2	BIOLÓGIA	52
5.2.1	Antimykobakteriálna aktivita.....	52
5.2.2	Cytotoxicita.....	55
6	ZÁVER	57
7	POUŽITÉ ZDROJE	59
8	ZOZNAM SKRATIEK	63
9	ZOZNAM OBRÁZKOV	65
10	ZOZNAM TABULIEK	65
11	PRÍLOHY	67

1 ÚVOD

Tuberkulóza (TBC) je súhrnné označenie pre všetky chorobné stavy, ktorých pôvodcom je *Mycobacterium tuberculosis complex (Mtb.)* [1]. Jedná sa o infekčné ochorenie, ktoré bolo hlavnou príčinou úmrtí spôsobenou jediným infekčným agens až do vypuknutia pandémie koronavírusu SARS-CoV-2 [2]. Terapia TBC pozostáva hlavne z dlhodobého súbežného podávania liečiv prvej línie (izoniazid, INH; rifampicín, RIF; pyrazínamid, PZA; etambutol, EMB) a nesie zo sebou množstvo nežiadúcich a vedľajších účinkov, v dôsledku čoho môže byť adherencia pacientov k liečbe nízka. Nedodržiavanie prísneho liečebného režimu z akéhokoľvek dôvodu, spolu s ďalšími faktormi, vedie k nárastu počtu rezistentných kmeňov mykobaktérií a tým kladie limity terapeutickému potenciálu dostupných liečiv. Rozlišujeme niekoľko základných druhov liekovej rezistencie TBC [2, 3]:

- **monorezistenciou** rozumieme odolnosť *Mtb.* voči jednému z liečiv 1. línie,
- rezistencia k viac než jednému liečivu 1. línie, okrem kombinácie INH a RIF, sa nazýva **polyrezistenciou**,
- **multilieková rezistencia** (MDR) predstavuje rezistenciu mykobaktérií súčasne aspoň k INH a RIF,
- ak je MDR-TBC ešte navyše odolná voči akémukoľvek fluorochinolónu a aspoň voči jednému z injekčne podávaných liečiv druhej línie (kapreomycín, kanamycín, amikacín), hovoríme o **extenzívnej liekovej rezistencii** (XDR).

Vývoj a zavádzanie nových liečiv predchádza rezistencii a je najdôležitejším aspektom pre budúcu kontrolu tuberkulózy [2]. Od objavu terapeutického potenciálu INH **1** v roku 1950 [1] a PZA v roku 1972 [4] sa dostávajú do popredia záujmu deriváty malých heterocyklických molekúl (napr. furánu, tiofenu, imidazolu, oxazolov, oxadiazolov, triazolov, tiadiazolov, piperidínu, pyrimidínu a ďalších). Doposiaľ bolo prezentované nespočetné množstvo zlúčenín s týmto štruktúrnym motívom, ktoré vykazovali vynikajúcu biologickú aktivitu (nie iba ako antituberkulotiká) [5] [6], no bohužiaľ doposiaľ iba dve vyššie zmienené zlúčeniny našli uplatnenie ako antituberkulotiká prvej línie (**Obr. 1**).



Obrázok 1 - Štruktúry INH **1** a PZA

2 TEORETICKÁ ČASŤ

Následkom nárastu počtu prípadov liekovo rezistentnej tuberkulózy sa výskum zameriava na hľadanie nových, účinných látok, ktoré by dokázali tento rozvoj rezistencie zastaviť.

2.1 NOVÉ ANTITUBERKULOTIKÁ

Pred štyridsiatimi rokmi minulého storočia nebola chemoterapia TBC dostupná. Od momentu izolácie streptomycínu (STR) z aktinomycéty *Streptomyces griseus* v roku 1944 nastala doba rozkvetu vo vývoji a zavádzaní ďalších nových liečiv k liečbe infekcie tuberkulózy [7]. Posledným významným objavom minulého storočia bolo zavedenie RIF v roku 1966, po ktorom vystriedala sériu prelomových pokrokov v liečbe tuberkulózy pauza trvajúca viac než štyri dekády, počas ktorej nebol vyvinutý žiadny nový liek prvej línie [8].

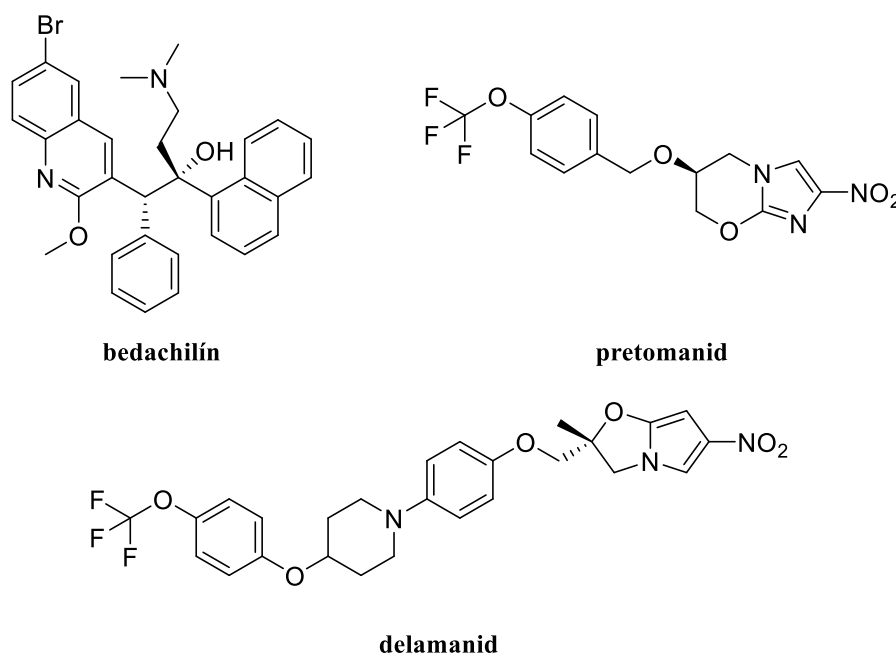
Túto dlhotrvajúcu pauzu ukončilo rozhodnutie US Food and Drug Administration (FDA) o schválenie nového antituberkulotika bedachilínu (**Obr. 2**) v roku 2012 [9]. Jedná sa o perorálne podávané úzkospektrálne antibiotikum vykazujúce aktivitu voči mykobaktériám, najmä *Mtb.* [10]. Z chemického hľadiska sa jedná o látku patriacu medzi diarylchinolíny obsahujúce chinolinové jadro, na ktoré sa v polohe C₃ napája diarylový a aminový bočný reťazec a ďalej alkoholová funkčná skupina, ktoré sú zodpovedné za jeho antimykobakteriálny účinok. Jedná sa o enantiomérne čistú zlúčeninu s dvomi chirálnymi centrami (1*R*, 2*S* izomér) [11]. Bedachilín vykazuje vynikajúcu aktivitu voči liekovo senzitívnej *Mtb.* ako aj rôznym liekovo rezistentným kmeňom *Mtb.* s hodnotami minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) od 0,03-0,12 µg/ml [12]. Bedachilín vykazuje jedinečný a špecifický mechanizmus účinku (MÚ), ktorý je založený na inhibícii protónovej pumpy ATP-syntázy, ktorý vedie k deplécii ATP (adenozíntrifosfát) a narušeniu rovnováhy v homeostáze pH [13, 14].

Ďalšie nové antimykobakteriálne pôsobiace liečivá patria do skupiny nitroimidazolov. Jedná sa konkrétne o skôr zavedený delamanid a nedávno schválený pretomanid (**Obr. 2**) [11].

Delamanid, inhibítor syntézy mykolových kyselín, bol prvý krát schválený Európskou liekovou agentúrou (EMA) v roku 2014 [13]. Ako bolo spomenuté vyššie, patrí medzi nitroimidazoly a konkrétne sa jedná o derivát nitroimidazooxazolu. Delamanid je proliečivo a tým pádom inhibíciu syntézy mykolových kyselín dosiahne až po jeho bioaktivácii, ktorá sa deje redukciou NO₂ skupiny na reaktívne medziprodukty, akými sú

napríklad oxidy dusíka a deriváty desnitro-imidazooxazolu [11]. Delamanid dokonca vykazuje ešte lepšiu aktivitu, než to bolo u bedachilínu. V *in vitro* štúdiách bola preukázaná aktivita voči liekovo senzitívnej *Mtb.* ako aj liekovo rezistentným kmeňom *Mtb.* s hodnotami MIC v rozmedzí 0,006-0,024 µg/ml [15].

Pretomanid predstavuje jedno z najnovších antituberkulotík – prvý krát bol schválený FDA pred tromi rokmi v auguste roku 2019 [16]. Možno sledovať viacero štrukturálnych podobností pretomanidu s jeho predchodcom, delamanidom, a vďaka prítomnosti NO₂ skupiny sa jedná taktiež o proliečivo, ktoré po aktivácii v mykobaktériách produkuje reaktívne medziprodukty schopné interakcie s bunecnými štruktúrami a narušiť bunkové dýchanie [17]. Pretomanid preukázal *in vitro* aktivitu proti *Mtb.* (vrátane rezistentných kmeňov a za anaeróbných podmienok) a u zvieracích modeloch TBC (ako monoterapia alebo ako súčasť kombináčného režimu) [16]. Podľa nedávnych štúdií sa MIC pretomanidu pohybuje v rozmedzí 0,015-0,531 µg/ml proti liekovo senzitívnym ako aj liekovo rezistentným kmeňom *Mtb.* [11].

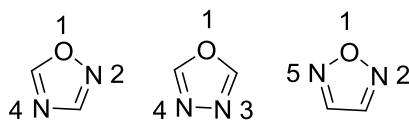


Obrázok 2 - Štruktúry nových registrovaných antituberkulotík (bedachilín, delamanid, pretomanid)

Všetky vyššie spomenuté liečivá patria medzi tzv. liečivá 3. línie, ktoré sú používané výhradne v terapii MDR- a XDR-TBC ako súčasť kombinovanej terapie [18, 19].

2.2 OXADIAZOLOVÝ FRAGMENT

Mnohé *de novo* syntetizované antimykobakteriálne účinné zlúčeniny obsahujú vo svojej štruktúre heterocyklus, ktorý je veľmi často reprezentovaný oxadiazolovým fragmentom [20]. Oxadiazoly sú 5-členné aromatické heterocykly, obsahujúce vo svojej štruktúre dva dusíkové a jeden kyslíkový atóm. Existujú tri stabilné regioizoméry nesubstituovaného oxadiazolu – 1,2,4-, 1,3,4- a 1,2,5-izomér (**Obr. 3**) [21].



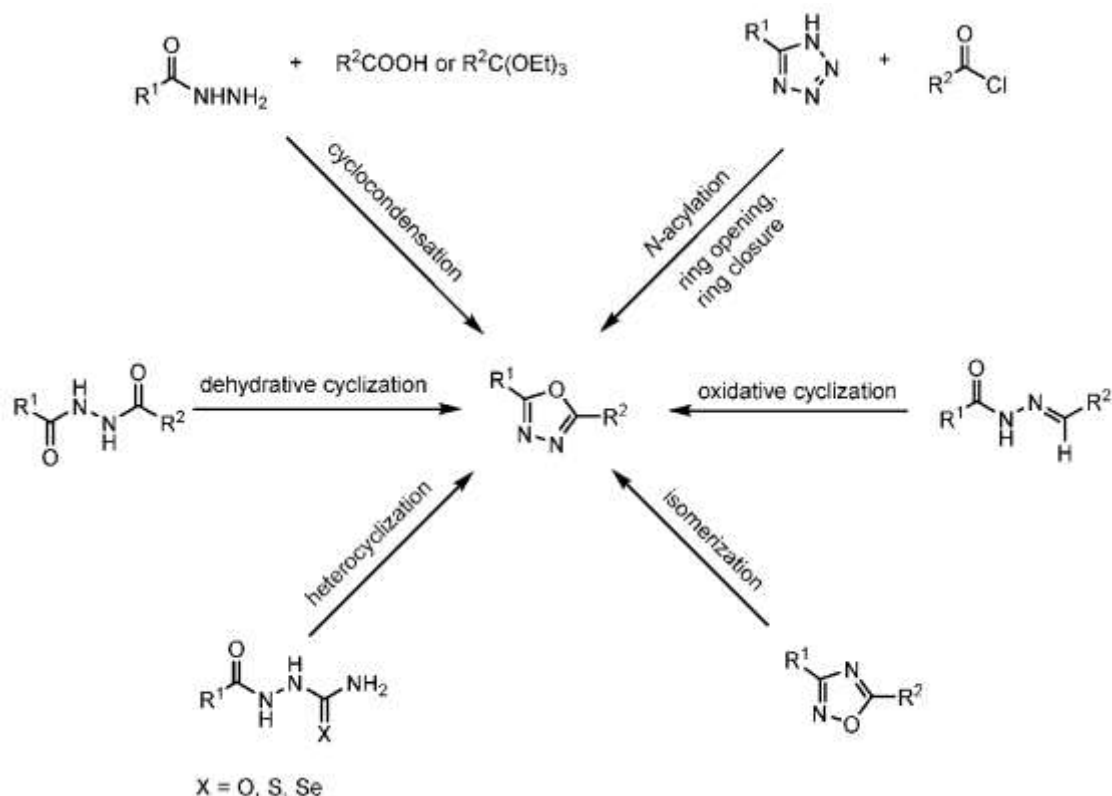
Obrázok 3 - Regioizoméry oxadiazolu

Ako najslubnejší kandidáti sa javia deriváty 1,3,4-oxadiazolu [20]. Prítomnosť 1,3,4-oxadiazolového kruhu dokáže ovplyvniť fyzikálne-chemické vlastnosti molekuly a môže slúžiť ako bioizostérna náhrada funkčných skupín obsahujúce karbonyl, akými sú napríklad estery, amidy, hydrazidy a karbamáty [21, 22]. Oxadiazolový kruh sa ďalej využíva aj ako významná súčasť farmakofóru, ktorý je schopný väzby na ligand, a v niektorých prípadoch zase slúži ako planárny aromatický linker, ktorý dokáže zabezpečiť správnu priestorovú orientáciu štruktúry [23].

Možností prípravy 2,5-disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov je hneď niekoľko (vid' **Obr. 4**). Bežne využívané metódy zahŕňajú použitie *N,N'*-diacylhydrazínov alebo *N*-acylhydrazónov [24]. *N,N'*-Diacylhydrazíny podstupujú proces dehydratívnej cyklizácie za použitia dehydratačných činidiel, akými sú napríklad trichlorid-oxid fosforečný, kyselina sírová, kyselina trifluóroctová či oxid fosforečný. Ďalej sa používajú aj miernejšie činidlá, ako napr. *p*-toluénsulfonylchlorid (v prostredí bázy, napr. pyridínu) alebo trifenyľfosfín (spolu s 1,2-dibromo-1,1,2,2-tetrachloroetánom v prostredí bázy, napr. triethylamínu, v nevodnom rozpúšťadle) [25-28]. V literatúre [29] bola taktiež popísaná „one-pot“¹ syntéza týchto derivátov 1,3,4-oxadiazolu, kedy do reakcie vstupuje acylhydrazid s karboxylovou kyselinou v prítomnosti kyslého katalyzátora. Deriváty 1,3,4-oxadiazolu môžu byť taktiež pripravené pomocou oxidatívnej cyklizácie *N*-acylhydrazónov s oxidačnými činidlami, ako napr. manganistan draselný, chlorid železitý alebo elementárny bróm [24]. Iné syntetické cesty zahŕňajú acyláciu nasledovanú otvorením a uzavretím kruhu východiskových tetrazolov, heterocyklizáciu derivátov

¹ „One-pot“ syntéza (tzv. „syntéza v jednej nádobe“) – stratégia na zlepšenie účinnosti chemickej reakcie, pri ktorej sa reaktant podrobí viacerým chemickým reakciám len v jednej nádobe bez izolácie medziproduktu

semikarbazidu, tiosemikarbazidu či selenosemikarbazidu, ako taktiež premenu derivátov 1,2,4-oxadiazolov pod vplyvom UV žiarenia [30].

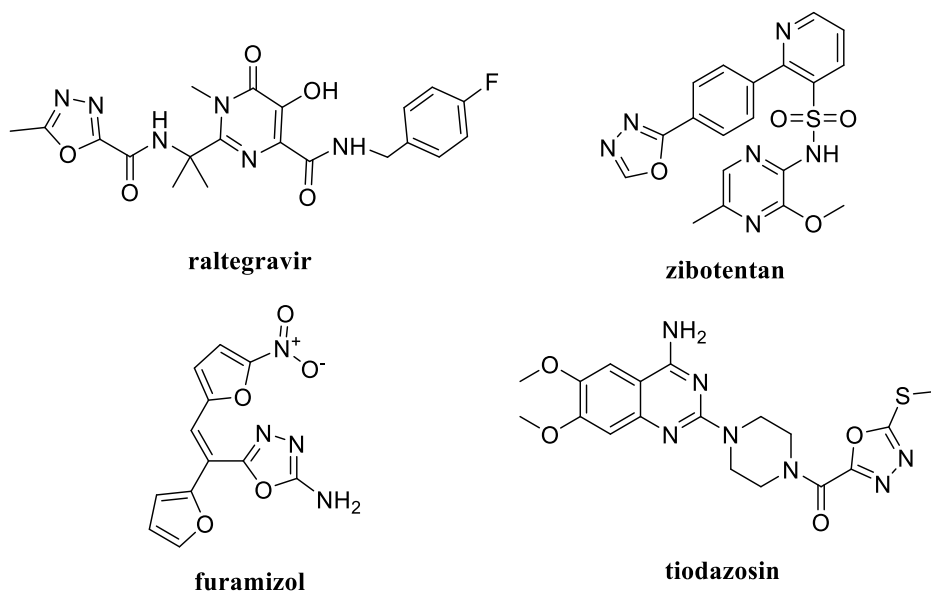


Obrázok 4 - Možné syntetické cesty prípravy 2,5-disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov (prevzaté z Kudelko, 2022 [30])

Zlúčeniny obsahujúce 1,3,4-izomér oxadiazolu vykazujú rozsiahle spektrum biologických aktivít. V literatúre nájdeme mimo iné aj zmienky ohľadom ich antibakteriálnej, antimykobakteriálnej, antivirotickej, protinádorovej, antikonvulzívnej, protizápalovej a hypoglykemickej aktivity [21, 25, 31].

Niektoré zlúčeniny obsahujúce 1,3,4-oxadiazol sa dostali aj do klinického použitia alebo je ich použitie predmetom klinických štúdií (štruktúry všetkých spomenutých látok v tomto odstavci sú uvedené na **Obr. 5**). Asi najznámejším registrovaným liečivom je raltegravir, vyznačujúci sa silným antivirotickým účinkom, ktorý je vyvolaný inhibíciou integrázy (enzým schopný integrácie vírusovej genetickej informácie do ľudskej deoxyribonukleovej kyseliny - DNA). V súčasnosti sa jedná o liečivo prvej línie v liečbe infekcie vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV). Ďalším liečivom je zibotentan, látka ktorá pôsobí ako špecifický antagonist receptorov pre endotelin-1, čím spôsobuje inhibíciu proliferácie buniek a pri vyšších koncentráciách má taktiež schopnosť inhibovať angiogéniu [30]. Zibotentan bol skúmaný pre použitie v liečbe metastázujúceho karcinómu prostaty, kde ale neuspel v klinických štúdiách, a preto sa už pre tento účel

d'alej neskúma [32, 33]. V súčasnosti ale prebiehajú ďalšie klinické štúdie, napr. pre použitie zibotentanu v liečbe chronickej choroby obličiek [34]. Fragment 1,3,4-oxadiazolu obsahuje aj derivát nitrofuranu, furamizol, ktorý vykazuje antibakteriálnu aktivitu. Ako posledný príklad stojí za zmienku blokátor adrenergných receptorov thiodiazosin s antihypertenznou aktivitou. Výhodou thiodiazosinu je jeho predĺžený plazmatický polčas v porovnaní s prazosínom (klinicky používaná látka s rovnakým MÚ). [30]



Obrázok 5 - Štruktúry liečiv obsahujúcich 1,3,4-oxadiazolový fragment

2.2.1 Krátky prehľad derivátov 1,3,4-oxadiazolu s antimykobakteriálnou aktivitou

Nasledujúci text predkladá stručný prehľad inak rôznorodej palety v literatúre publikovaných derivátov 1,3,4-oxadiazolu vykazujúcich antimykobakteriálnu aktivitu. O štruktúrach zlúčenín spomínaných v texte pojednávajú obrázky **Obr. 6** a **Obr. 7**.

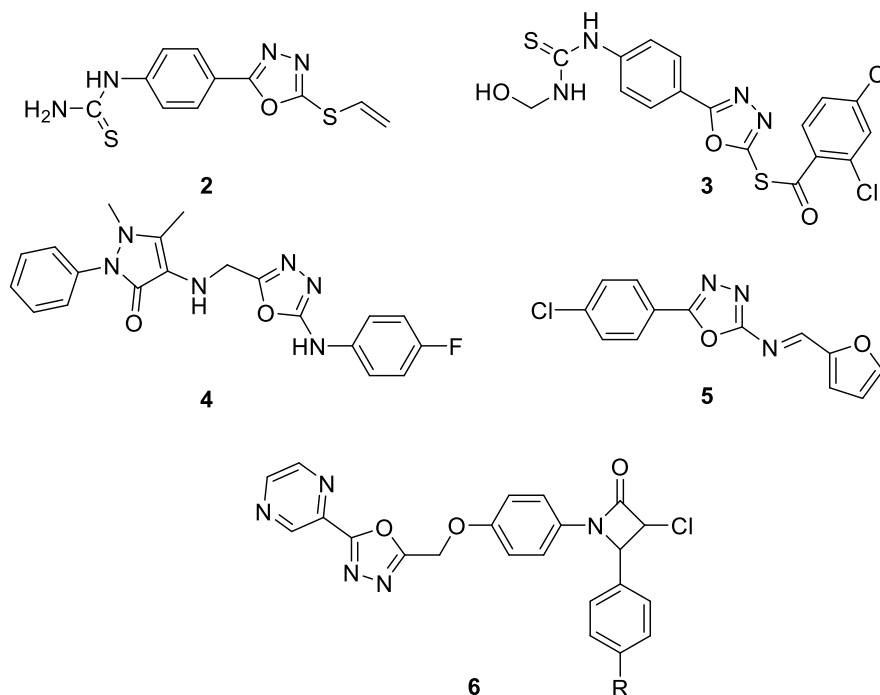
Macaev *et al.* [35] sa vo svojej štúdii zaoberali prípravou a hodnotením derivátov 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazolov. Ako východisková látka bol použitý 5-(4-izotiokyanatofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol, ktorý podliehal alkylácii SH skupiny a/alebo adícii rôznych nukleofilov na izotiokyanátovú skupinu. U pripravených zlúčenín bola stanovená ich *in vitro* antimykobakteriálna aktivita voči *Mtb. H₃₇Rv* za použitia mikrodilučného Alamar Blue testu. Najvyššiu inhibičnú aktivitu – 98% inhibíciu pri koncentrácii 6,25 µg/ml – vykazovali zlúčeniny **2** a **3**.

V práci Ahsana *et al.* [36] sa môžeme dočítať o sérii analógov 1,5-dimetyl-2-fenyl-4-{{5-(arylamino)-1,3,4-oxadiazol-2-yl}metylamino}-1,2-dihydro-3*H*-pyrazol-3-ónu. Autori došli k záveru, že na aktivitu voči mykobaktériám vplýva substitúcia na *N*-aryl skupine. Pozitívny efekt so sebou nesie prítomnosť elektrón-odťahujúcej skupiny,

napríklad fluór, nitro či sulfamoyl. Práve fluórom substituovaná zlúčenina **4** vykazovala najlepšiu aktivitu z celej série, ktorej MIC₉₀ (0,78 µg/ml) sa rovnala MIC použitého štandardu INH.

Sériu *N*-(furán-2-yl)-1-(5-substituovaných)fenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)metanimínov syntetizovali Mathew *et al.* [37] a pripravené zlúčeniny boli hodnotené pre ich aktivitu proti *Mtb.* H₃₇Rv pomocou mikrodilučného testu Alamar Blue. Najlepšie výsledky tejto série dosiahla zlúčenina **5** s MIC 3,125 ug/ml.

S cieľom spojiť 1,3,4-oxadiazol, β-laktamový kruh (2-azetidínón) a pyrazinový kruh do jedného molekulového hybridu, pripravili autori práce [38] novú sériu derivátov 3-chloro-4-aryl-1-(4-{[5-(pyrazin-2-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]metoxy} fenyl)azetidín-2-ónu **6**. Učinili tak na základe poznatkov o antibakteriálnej a antimykobakteriálnej aktivite zlúčenín obsahujúcich vyššie spomenuté štruktúrne motívy. Z pripravenej série zlúčenín sa javia ako najľubnejšie zlúčeniny nesúce ako substituent R buď Cl (**6a**), alebo metoxyskupinu (**6b**), ktorých MIC voči *Mtb.* H₃₇Rv predstavuje 3,12 µg/ml.



Obrázok 6 - Štruktúry najaktívnejších oxadiazolových zlúčenín

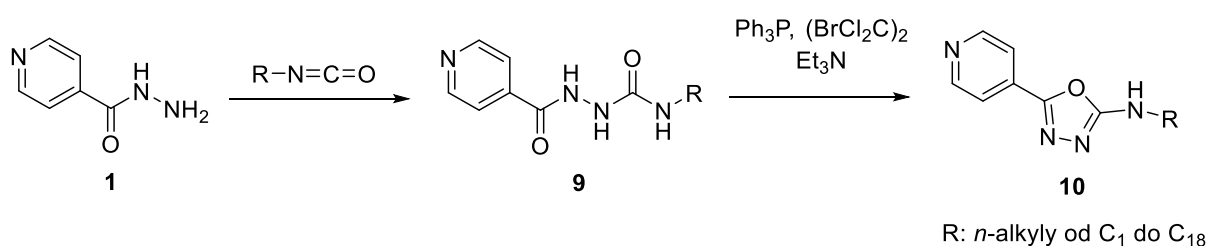
Zlúčeniny obsahujúce 1,3,4-oxadiazolový fragment s antimykobakteriálnou aktivitu boli taktiež pripravené v našej výskumnej skupine [28, 39-41].

Napríklad Karabanovich *et al.* [39] nasyntetizovali sériu nitro-substituovaných 2-alkyl/aryl-5-benzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolov. Výsledky hodnotenia antimykobakteriálnej aktivity potvrdili predchádzajúce skúsenosti, že prítomnosť

2.3 FUNKČNÉ SKUPINY SPÁJAJÚCE ALKYL S 1,3,4-OXADIAZOLOM

2.3.1 Alkylované deriváty 5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínu

Vosátka *et al.* [28] pripravili sériu sedemnástich *N*-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov **10** s cieľom nájsť nové zlúčeniny s antimykobakteriálnou aktivitou. Ako východiskové látky použili *N*-alkyl-2-izonikotinoylhydrazín-1-karboxamidy **9**, ktoré boli pripravené reakciou INH **1** s odpovedajúcimi alkylizokyanátmi (alebo ich ekvivalentmi v prípade metylovaného derivátu). Dĺžka alkylového reťazca v izokyanátoch sa pohybovala od metylu až po oktadecyl s výnimkou heptadecylového reťazca. Požadované 1,3,4-oxadiazoly **10** boli získané dehydratívnou cyklizáciou východiskových látok pomocou trifenyľfosfínu a 1,2-dibrómo-1,1,2,2-tetrachlóretánu v zásaditom prostredí (**Obr. 8**).



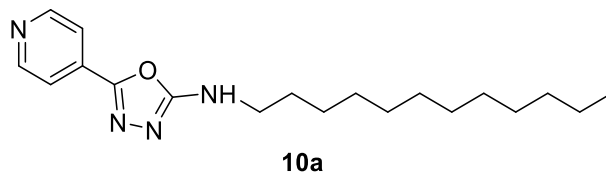
Obrázok 8 - Syntéza *N*-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov

U pripravených zlúčenín bola hodnotená ich *in vitro* antimykobakteriálna aktivita voči senzitívnemu kmeňu *Mtb.*, niekoľkým kmeňom *Mtb.* s rôznymi profilmi rezistencie, vrátane MDR a XDR kmeňov a taktiež voči trom netuberkulóznym mykobakteriálnym kmeňom (*M. avium* 331/88 a dva rôzne kmene *M. kansasii*: 235/80 a klinický izolát 6509/96). Aktivita bola vyjadrená ako MIC v μM .

Zistilo sa, že z hľadiska inhibície INH-senzitívnej *Mtb.* boli najúčinnjšie karboxamidy **9** substituované krátkym alkylovým reťazcom (metyl až propyl). Tieto zlúčeniny mali aktivitu porovnateľnú s INH **1** (MIC = 0,5-2 μM). No bohužiaľ, ani jeden z prezentovaných karboxamidov neinhiboval uspokojivo žiaden z MDR či XDR kmeňov TBC. Neúčinnosť predmetných karboxamidov voči týmto kmeňom si autori práce vysvetľujú tým, že majú rovnaký MÚ ako samotný INH. Dokonca ich cyklizáciou došlo aj k strate pôvodnej inhibičnej aktivity voči INH-senzitívnej *Mtb.*

Aj keď vyššie spomenuté karboxamidy s krátkym reťazcom svoju schopnosť inhibície *Mtb.* po cyklizácii na príslušné 1,3,4-oxadiazoly stratili, v prípade cyklizácie *N*-dodecyl-2-izonikotinoylhydrazín-1-karboxamidu na oxadiazol **10a** (**Obr. 9**) došlo k výraznému zníženiu MIC (z 32 μM na 4-8 μM) voči INH-senzitívnej *Mtb.* v porovnaní

s prekuzorom **9** s dodecylovým reťazcom. Dokonca bola zaznamenaná aj schopnosť inhibovať vybrané MDR a XDR kmene *Mtb.* (MIC = 4-8 μ M), rovnako ako aj INH-rezistentnú *M. avium* 330/88 (MIC = 8-16 μ M) a to bez skríženej rezistencie voči bežne užívaným antimykobakteriálnym liečivám.

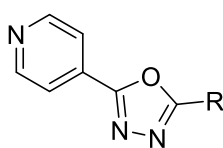


Obrázok 9 - *N*-dodecyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín

MÚ zlúčeniny **10a** nie je celkom objasnený, no isté je, že sa nejedná o proliečivo INH **1**. Vyššie uvedené zistenia inšpirovali túto prácu a dali vznik niekoľkým štruktúrnym obmenám zlúčeniny **10a**.

2.3.2 4-(5-Substituované-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridíny

Syntézou a hodnotením antimykobakteriálnych vlastností 4-(5-substituovaných-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridínových derivátov sa zaoberali Navarrete-Vázquez *et al.* [42]. Prostou reakciou INH **1** s rôznymi acylchloridmi a následnou dehydratívnou cyklizáciou vzniknutých *N*^c-acylizonikotinohydrazidov – „one-pot“ syntéza v *N,N*-dimetylformamide (DMF) – pripravili okrem iných, taktiež zlúčeniny **11a-11e**, ktoré sú predmetom záujmu tejto práce (**Obr. 10**). Zistili pozoruhodné aktivity voči INH-senzitívnej *Mtb.* H₃₇Rv. Zmienené zlúčeniny sa ďalej testovali na piatich klinických izolátoch *Mtb.* s rôznymi profilmi rezistencie (**Tab. 1**).



- 11a**; R = CH₃
- 11b**; R = CF₃
- 11c**; R = CH₂Cl
- 11d**; R = C₁₅H₃₁
- 11e**; R = C₁₇H₃₅

Obrázok 10 - Zlúčeniny Navarrete-Vázqueze *et al.*

Zlúčenina **11a** vykazovala skôr miernu aktivitu voči *Mtb.* H₃₇Rv. Podobný trend bol autormi zaznamenaný taktiež pri testoch na klinických izolátoch s výnimkou INH-senzitívneho kmeňa CIBIN 687. K zlepšeniu aktivity nedošlo ani v prípade nahradenia metylovej skupiny za trifluórmetylovú (**11b**), rovnako ako chlórmetylovú skupinu (**11c**). Bolo konštatované, že 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazoly, substituované krátkym alkylom (metyl a etyl) neprinášajú žiaden zásadný tuberkulostatický *in vitro* efekt [42].

Tabuľka 1 - MIC vybraných zlúčenín **11**

Kód	R	<i>Mtb.</i> H ₃₇ Rv	Klinické izoláty <i>Mtb.</i> MIC [µM]				
			CIBIN 687	CIBIN 650	CIBIN 675	CIBIN 234	CIBIN 112
11a	CH ₃	49,69	6,21	49,69	49,69	49,69	49,69
11b	CF ₃	37,21	37,21	37,21	37,21	37,21	37,21
11c	CH ₂ Cl	41,03	41,03	41,03	41,03	41,03	41,03
11d	C ₁₅ H ₃₁	0,35	0,70	0,09	11,19	22,38	2,80
11e	C ₁₇ H ₃₅	0,65	0,65	0,16	10,37	20,75	2,59
INH	-	0,44	0,91	0,91	29,19	58,38	29,19
STR	-	0,86	-	0,10	6,87	55,02	55,02
RIF	-	0,07	-	-	0,94	121,51	3,79
EMB	-	9,80	-	-	-	-	78,31

CIBIN 687 a 650 sú citlivé voči antituberkulotikám 1. línie; CIBIN 675 je rezistentný na STR a INH; CIBIN 234 je rezistentný na STR, INH, RIF a PZA; CIBIN 112 je rezistentný na STR, INH a EMB.

Naproti tomu zlúčeniny **11d** a **11e** vykazovali desaťkrát vyššiu inhibičnú aktivitu voči kmeňu *Mtb.* rezistentnému k INH, STR a EMB (CIBIN 112) v porovnaní s INH **1**, a dokonca dvadsaťkrát vyššiu inhibičnú aktivitu voči rovnakému kmeňu *Mtb.* v porovnaní so STR. Tieto zlúčeniny sú dokonca dvadsaťsedemkrát aktívnejšie v porovnaní s EMB (Tab. 1) [42].

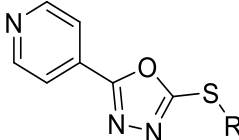
Autori sa domnievajú, že práve lipofilný charakter vyššie spomenutých zlúčenín **11d** a **11e** významne uľahčuje prestup týchto molekúl cez bakteriálnu membránu bohatú na mastné kyseliny s dlhým reťazcom (tzv. mykolové kyseliny) [42]. Zlúčeniny **11d** a **11e** si teda zaslúžia ďalšiu pozornosť najmä preto, že sa podľa tvrdenia autorov pravdepodobne nejedná o proliečivo INH **1**, ako aj preto, že autori pôvodnej štúdie sa bližšie nezaoberali stanovením MÚ. Taktiež nesledovali ich inhibičnú aktivitu voči netuberkulóznym kmeňom mykobaktérií [42].

2.3.3 Alkylované deriváty 5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-tiolu

5-(Pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-tiol **12** (Tab. 2) bol mnohokrát skúmaný s rôznou úspešnosťou, ako prekursor pre prípravu nových zlúčenín s rozličnou pôvodne zamýšľanou biologickou aktivitou. Synteticky je ľahko dostupný reakciou INH **1** so sírouhlíkom v prítomnosti hydroxidu draselného. Napríklad štúdia [43] hodnotila deriváty zlúčeniny **12** ako antineoplastiká, kdežto Chandra *et al.* [44] skúmali protizápalovú a analgetickú aktivitu derivátov tejto zlúčeniny. Ostatní videli zlúčeniny odvodené od štruktúry **12** ako sľubné inhibítory rôznych enzýmov, napríklad tyrozinázy [45], glykogén syntázy-kinázy 3 [46] a katepsínu K [47]. Avšak antimykobakteriálne vlastnosti tejto zlúčeniny ako aj jej derivátov sú popísané v literatúre iba obmedzene.

Bayrak *et al.* [48] získali alkyláciou tiolu **12** pomocou etylbromidu v prítomnosti etanolátu sodného generovaného *in situ* zlúčeninu **13** (Tab. 2). Obe predmetné zlúčeniny **12** a **13** boli hodnotené pre ich antibakteriálnu aktivitu. Východiskový tiol **12** nevykazoval významnú aktivitu voči vybraným mikrobiálnym kmeňom. Z Tab. 2 vyplýva, že veľkosť inhibičných zón zlúčeniny **13** bola vo väčšine prípadoch väčšia (s výnimkou inhibície *Staphylococcus aureus*) v porovnaní s inhibičnými zónami ampicilínu.

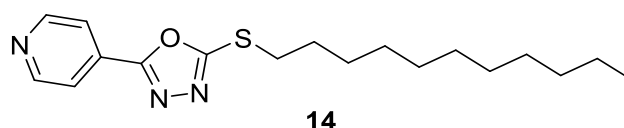
Tabuľka 2 - Veľkosti inhibičných zón zlúčenín **12** a **13**



Kód	R	Mikroorganizmus a inhibičná zóna (mm)							
		Ec	Yp	Pa	Ef	Sa	Bc	Ct	Ca
12	H	-	-	-	-	10	-	30	25
13	CH ₂ CH ₃	30	22	25	25	25	18	7	7
AMP	-	10	18	18	10	35	15	-	-
FLU	-	-	-	-	-	-	-	25	25

Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, Ef: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Bc: *Bacillus cereus* 702 Roma, Ct: *Candida tropicalis* ATCC 13803, Ca: *Candida albicans* ATCC 60193. AMP: Ampicilín, FLU: Flukonazol, (-): žiadna aktivita.

V literatúre bola diskutovaná taktiež antifungálna aktivita zlúčeniny **14** voči širokému spektru rastlinných patogénov (Obr. 11). Inhibícia bola vyjadrená v percentách pri koncentrácii 500 µg/ml. Slabá inhibičná aktivita bola zaznamenaná voči väčšine hodnotených patogénov, napríklad voči *Phytophthora infestans*, *Corynespora cassicola* a *Rhizoctonia solani* (0,24 %; 3,55 % a 0 %). Táto zlúčenina dokonca dokázala urýchliť rast *Bortrytis cinerea*. Jedine kmeň *Phytium ultimum* vyznačoval vysokú citlivosť voči tejto zlúčenine (77,87% inhibícia), kdežto kontrolne použité látky (medzi nimi aj validamycín, chlórtonil a procymidón) nemali žiaden efekt na tento kmeň. Aj túto zlúčeninu je možné ľahko pripraviť priamou alkyláciou zlúčeniny **12**. Ako alkylačné činidlo bol použitý undecylchlorid v prítomnosti hydroxidu sodného v zmesi DMF a vody [49].



Obrázok 11 - 2-(Pyridín-4-yl)-5-(undecyltio)-1,3,4-oxadiazol

V literatúre však nenájdeme zmienky o antimykobakteriálne pôsobiacich alkylovaných derivátov 5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-tiolu.

3 CIELE PRÁCE

Cieľom práce je overiť vplyv prítomnosti sekundárnej aminoskupiny v sérii *N*-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov a *N*^c-acylizonikotinohydrazidov, ako ich syntetických prekursorov na antimykobakteriálnu aktivitu. Toto bude realizované izostérnou zámenou aminoskupiny za metylénovú skupinu -CH₂- pri zachovaní pôvodných dĺžok alkylov. Na základe získaných dát, predovšetkým hodnôt MIC, budú navrhnuté ďalšie štruktúrne obmeny, ktoré by mohli viesť k ďalšiemu vylepšeniu farmakochemického profilu skúmaných zlúčenín. Zmyslom práce je pripraviť ucelenú sériu originálnych zlúčenín s potenciálnou antimykobakteriálnou aktivitou a vyjadriť štruktúrne-aktivitné vzťahy v rámci tejto série a voči referenčnej sérii [28]. Získané poznatky budú ďalej využívané v príprave zlúčenín s obdobným štruktúrnym motívom.

V rámci novej základnej série bude ako východisková látka pre syntézy použitý INH **1**, ktorý bude reagovať s príslušným acylchloridom (komerčne dostupným alebo pripraveným na pracovisku v čas potreby) v prítomnosti zásady. Takto získaný 1,2-diacylhydrazín bude premenený na príslušný 2,5-disubstituovaný 1,3,4-oxadiazol dehydratívnou cyklizáciou. Takto získané zlúčeniny budú charakterizované súborom bežných fyzikálne-chemických metód (teplota topenia, retenčný faktor pri TLC, elementárna analýza, IČ spektroskopia, NMR spektroskopia ¹H a ¹³C jadier).

Všetky pripravené zlúčeniny budú hodnotené pre ich *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu proti citlivému kmeňu *Mtb.* H₃₇Rv a dvom kmeňom netuberkulózných mykobaktérií (*M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 6509/96). U zlúčenín s najnižšími zaznamenanými hodnotami MIC bude skúmaná aktivita voči vybraným MDR- a XDR-TBC kmeňom.

Ďalej bude u vybranej skupiny zlúčenín stanovená ich cytotoxicita za použitia bunkovej línie ľudského hepatocelulárneho karcinómu HepG2. Ako miera cytotoxicity bude použitý parameter inhibičnej koncentrácie, ktorá znižuje životaschopnosť bunkovej populácie na 50 % z maximálnej životaschopnosti (IC₅₀), ktorá umožní kvantitatívne porovnanie toxicity medzi testovanými zlúčeninami.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 CHEMICKÁ ČASŤ

4.1.1 Obecná metodika

Všetky chemikálie použité na syntézu a analýzu boli zakúpené od firiem Merck KGaA (Darmstadt, Nemecko), Penta Chemicals Unlimited (Praha, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) alebo Apollo Scientific Ltd (Stockport, Veľká Británia) a boli použité bez ďalších úprav.

Štruktúra všetkých pripravených zlúčenín bola potvrdená pomocou ^1H NMR a ^{13}C NMR analýzy. NMR spektrá (500 MHz alebo 600 MHz pre ^1H a 126 alebo 151 MHz pre ^{13}C) boli zmerané v DMSO- d_6 pri laboratórnej teplote alebo pri teplote 60 °C na prístrojoch Varian VNMR S500 (Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JEOL JNM-ECZ 600R (JEOL, Akishima, Tokyo, Japonsko) – doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc., a PharmDr. Jana Křoustková, Ph.D. Hodnoty chemických posunov (δ) sú vyjadrené v partes per million (ppm) a spektrá sú vnútorne kalibrované na reziduálny signál aprotického rozpúšťadla voči tetrametylsilánu (DMSO- d_6 : 2,50 pre ^1H , 39,70 pre ^{13}C). Hodnoty interakčných konštánt (J) sú vyjadrené v Hz. NMR spektrá boli vyhodnotené pomocou programu MestReNova 14.2.3 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španielsko).

Infračervené spektrá boli zaznamenané na spektrometri Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmedzí 600-4000 cm^{-1} , meranie prebehlo technikou ATR na germániovom kryštáli. Spektrá boli zmerané Ivou Vencovskou.

Elementárna analýza bola prevedená pomocou prístroja Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Nemecko). Vypočítané aj zmerané hodnoty sú zadané v percentách.

Teploty topenia boli získané meraním v otvorenej sklenenej kapiláre za použitia prístroja Büchi B-545 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švajčiarsko), získané hodnoty sú vyjadrené ako interval a neboli korigované.

Retenčné faktory (R_f) pripravených zlúčenín, rovnako ako priebeh reakcií boli zisťované tenkovrstevnou chromatografiou (TLC); tenké vrstvy boli zakúpené od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Nemecko), hliníková doska bola potiahnutá silikagélom Merck 60 F254 o hrúbke 0,2 mm. Vizualizácia bola uskutočňovaná pomocou UV žiarenia ($\lambda = 254 \text{ nm}$). Ako mobilná fáza (MF) k vyvíjaniu chromatogramu a pre kolónovú

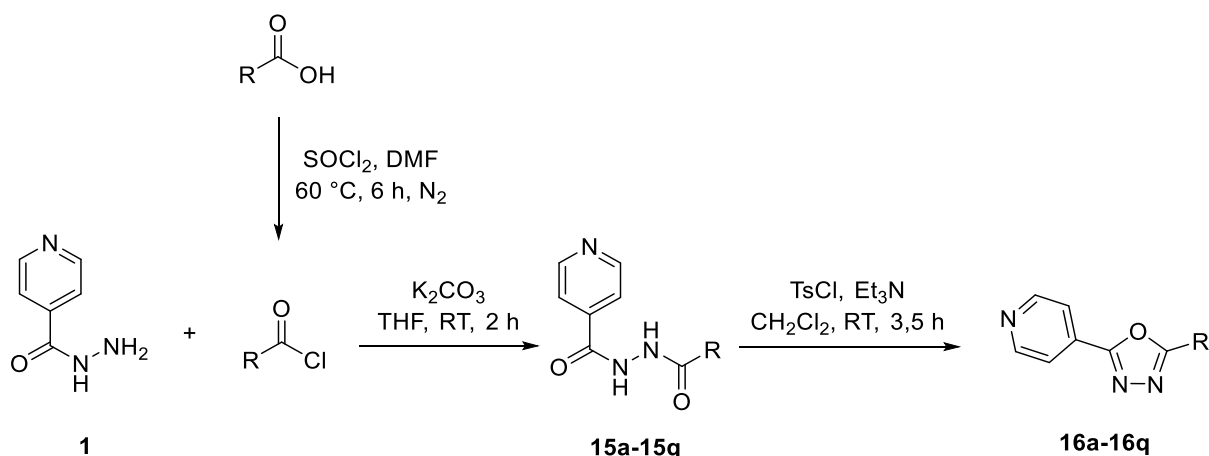
chromatografiu bola použitá zmes dichlórmetán (DCM)/metanol (MeOH) v objemovom pomere 93:7 pre *N*'-acylizonikotinohydrazidy a zmes DCM/MeOH v objemovom pomere 97,5:2,5 pre 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazoly. Silikagél Merck Kieselgel 60 Å (0.040-0.063 mm) sa použil ako stacionárna fáza ku kolónovej chromatografii (Merck KGaA, Darmstadt, Nemecko).

Vypočítané hodnoty $\log P$ ($\text{Clog}P$), ktoré sú logaritmom rozdeľovacích koeficientov pre systém oktan-1-ol/voda boli získané fragmentačnou metódou podľa Crippena [50] prostredníctvom programu ChemDraw Professional 20.0 (PerkinElmer Inc., MA, USA).

Vzorcie a reakčné schémy boli navrhnuté v programe ChemDraw Professional 20.0 (PerkinElmer Inc., MA, USA).

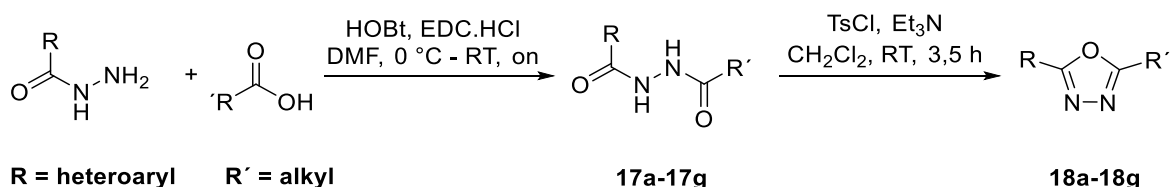
4.1.2 Syntéza a charakterizácia zlúčenín

O syntéze zlúčenín **15a-15q** a **16a-16q** pojednáva **Obr. 12**.



Obrázok 12 - Schéma prípravy zlúčenín **15a-15q** a **16a-16q**; DMF – *N,N*-dimetylformamid; THF – tetrahydrofurán; RT – room temperature (laboratórna teplota); TsCl – *p*-toluénsulfonylchlorid.

Prípravu zlúčenín **17a-17g** a **18a-18g** popisuje **Obr. 13**.



Obrázok 13 - Schéma prípravy zlúčenín **17a-17g** a **18a-18g**; HOBt - 1-hydroxybenzotriazol hydrát; EDC.HCl - *N*-(3-dimetylamínopropyl)-*N*'-etylkarbodiimid hydrochlorid; on – over night (cez noc).

4.1.2.1 Syntéza acylchloridov

Nasledujúcou metódou boli pripravené komerčne nedostupné acylchloridy: undekanoylchlorid, tridekanoylchlorid, pentadekanoylchlorid, heptadekanoylchlorid (**Obr. 12**). Ostatné acylchloridy boli zakúpené.

Do predsušenej banky podľa Schlenka (100 ml) sa pod dusíkovou atmosférou vnieslo 1,1 mmol príslušnej karboxylovej kyseliny. K tomu sa pridalo 5 ml chloridu tionylu a 2 kvapky bezvodého DMF. Reakčná zmes bola pod dusíkovou atmosférou zahrievaná na 60 °C pod spätným chladičom po dobu 6 hodín. Chlorid tionylu bol oddestilovaný a pripravený acylchlorid bol následne ihneď použitý k syntéze príslušných *N'*-acylizonikotinohydrazidov .

4.1.2.2 Syntéza *N'*-acylizonikotinohydrazidov (**15a-15f**) – Metóda č. 1

1 mmol (137,1 mg) INH **1** bol spoločne s 2 ekvivalentmi (2 mmol, 276,4 mg) uhličitanu draselného suspendovaný v 15 ml bezvodého tetrahydrofuránu (THF). Reakčná zmes bola schladená na 0 °C a za stáleho miešania bol po kvapkách pridaný 1,1 ekvivalent (1,1 mmol) príslušného acylchloridu. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať do úplnej či prijateľnej konverzie (indikácia pomocou TLC). Následne bol THF odparený na rotačnej vákuovej odparke (RVO) a surový produkt bol rozpustený v 10 ml demineralizovanej vody. pH vzniknutého roztoku bolo adjustované pomocou 0,5M roztoku kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu približne 6. Voda bola z reakčnej zmesi odparená na RVO. Zbytok po odparení bol suspendovaný v acetóne a nerozpustený anorganický podiel bol odfiltrovaný. Z filtrátu bol odparený acetón, získaný surový produkt bol prečistený kolónovou chromatografiou (MF: DCM + MeOH; 93:7 ^{v/v}), následne kryštalizovaný z etylacetátu alebo acetonitrilu.

N'-Acetylizonikotinohydrazid **15a**. Biela pevná látka; výťažok 73%; T_f 159,4-160,7 °C (etylacetát) (162-164 °C [51]). **IR**: 650, 663, 698, 755, 852, 896, 1003, 1066, 1223, 1298, 1359, 1383, 1411, 1553, 1652 (ν CONH), 1684 (ν CONH), 2953 (ν_s CH₃), 2996 (ν_{as} CH₃), 3047 (ν C-H arom.), 3205 (ν N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.58 (1H, s, NH), 9.96 (1H, s, NH), 8.71 (2H, d, J = 6.2 Hz, H2, H6), 7.73 (2H, d, J = 6.2 Hz, H3, H5), 1.89 (3H, s, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.96, 164.48, 150.93, 140.07, 121.82, 21.11. **Elementárna analýza** pre C₈H₉N₃O₂ (179,18); výpočtom C, 53.63; H, 5.06; N, 23.45, nájdené C, 53.49; H, 5.24; N, 23.59. **R_f**: 0,11.

N'-Propionylizonikotinohydrazid **15b**. Biela pevná látka; výťažok 79%; T_f 132,2-134,4 °C (etylacetát) (131,5 °C [52]). **IR**: 630, 663, 678, 759, 846, 861, 962, 991, 1062, 1085, 1118, 1169, 1221, 1270, 1381, 1404, 1432, 1464, 1496, 1553, 1559 (ν CONH), 1672, 2850 (ν_s CH₂), 2883 (ν_s CH₃), 2926 (ν_{as} CH₂), 2959 (ν_{as} CH₃), 3034 (ν C-H arom.), 3196 (ν N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.91 (1H, s, NH), 8.73 – 8.71

(2H, m, H2, H6), 7.73 – 7.72 (2H, m, H3, H5), 2.17 (2H, q, $J = 7.6$ Hz, CH₂), 1.03 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO, 151 MHz): δ 172.81, 164.50, 150.94, 140.07, 121.82, 27.05, 10.18. **Elementárna analýza** pre C₉H₁₁N₃O₂ (193,21); výpočtom C, 55.95; H, 5.74; N, 21.75; nájdené C, 55.84; H, 5.79; N, 21.83. **R_f**: 0,16.

***N*'-Butyrylizonikotinohydrazid 15c.** Biela pevná látka; výtťažok 68%; T_i 142,7-144,6 °C (etylacetát) (139 °C [52]). **IR**: 634, 638, 654, 667, 680, 716, 742, 754, 846, 882, 990, 1044, 1064, 1086, 1120, 1170, 1218, 1242, 1281, 1403, 1465, 1494, 1553, 1597 (v CONH), 1671, 2854 (v_s CH₂), 2873 (v_s CH₃), 2934 (v_{as} CH₂), 2959 (v_{as} CH₃), 3033 (v C-H arom.), 3200 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.59 (1H, s, NH), 9.95 (1H, s, NH), 8.77 – 8.74 (2H, m, H2, H6), 7.78 – 7.75 (2H, m, H3, H5), 2.17 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, C²H₂), 1.62 – 1.53 (2H, m, C³H₂), 0.92 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 171.55, 164.12, 150.57, 139.70, 121.47, 35.34, 18.67, 13.71. **Elementárna analýza** pre C₁₀H₁₃N₃O₂ (207,23); výpočtom C, 57.96; H, 6.32; N, 20.28, nájdené C, 57.87; H, 6.37; N, 20.35. **R_f**: 0,18.

***N*'-Pentanoylizonikotinohydrazid 15d.** Biela pevná látka; výtťažok 73%; T_i 165,4-167,1 °C (etylacetát). **IR**: 607, 626, 630, 638, 643, 654, 659, 666, 701, 746, 858, 912, 1002, 1062, 1108, 1167, 1221, 1237, 1257, 1323, 1330, 1363, 1375, 1415, 1472, 1490, 1517, 1521, 1539, 1544, 1559, 1604, 1665 (v CONH), 1698, 1711 (v CONH), 2851 (v_s CH₂), 2872 (v_s CH₃), 2932 (v_{as} CH₂), 2959 (v_{as} CH₃), 3029 (v C-H arom.), 3255 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.91 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H2, H6), 7.74 – 7.71 (2H, m, H3, H5), 2.16 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C²H₂), 1.52 – 1.48 (2H, m, C³H₂), 1.31 – 1.28 (2H, m, C⁴H₂), 0.85 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO, 151 MHz): δ 172.05, 164.47, 150.94, 140.06, 121.83, 33.50, 27.72, 22.21, 14.23. **Elementárna analýza** pre C₁₁H₁₅N₃ (221,26); výpočtom C, 59.71; H, 6.83; N, 18.99, nájdené C, 59.78; H, 6.91; N, 19.10. **R_f**: 0,20.

***N*'-Hexanoylizonikotinohydrazid 15e.** Biela pevná látka; výtťažok 83%; T_i 121,6-122,3 °C (etylacetát). **IR**: 611, 637, 652, 658, 669, 679, 719, 758, 844, 871, 1000, 1065, 1093, 1123, 1168, 1199, 1219, 1248, 1270, 1291, 1403, 1428, 1469, 1494, 1552, 1598 (v CONH), 1647, 1672, 1684, 1697, 2850 (v_s CH₂), 2870 (v_s CH₃), 2932 (v_{as} CH₂), 2951 (v_{as} CH₃), 3032 (v C-H arom.), 3201 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H2, H6), 7.74 – 7.71 (2H, m, H3, H5), 2.15 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, C²H₂), 1.55 – 1.49 (2H, m, C³H₂), 1.29 – 1.23 (4H, m, C⁴H₂, C⁵H₂), 0.84 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO, 151 MHz): δ 172.05, 164.47, 150.93, 140.07, 121.83, 33.75, 31.28, 25.25, 22.39, 14.39. **Elementárna analýza** pre C₁₂H₁₇N₃O₂ (235,29) výpočtom C, 61.26; H, 7.28; N, 17.86, nájdené C, 61.38; H, 7.26; N, 17.89. **R_f**: 0,23.

***N*'-Heptanoylizonikotinohydrazid 15f.** Biela pevná látka; výtťažok 72%; T_i 103,1-105,7 °C (acetonitril). **IR**: 637, 645, 650, 659, 665, 680, 721, 731, 758, 847, 872, 885, 990, 1015, 1063, 1091, 1122, 1170, 1219, 1236, 1255, 1277, 1402, 1472, 1494, 1507, 1552, 1599 (v CONH), 1647, 1654, 1671, 2854 (v_s CH₂), 2919 (v_s CH₃), 2932 (v_{as} CH₂), 2956 (v_{as} CH₃), 3033 (v C-H arom.), 3199 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.56 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H2, H6), 7.74 – 7.73 (2H, m, H3, H5), 2.15 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, C²H₂), 1.52 – 1.49 (2H, m, C³H₂), 1.31 – 1.20 (6H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.47,

150.93, 140.07, 121.84, 33.80, 31.55, 28.75, 25.55, 22.54, 14.46. **Elementárna analýza** pre C₁₃H₁₉N₃O₂ (249,31); výpočtom C, 62.63; H, 7.68; N, 16.85, nájdené C, 62.54; H, 7.60; N, 16.83. **R_f**: 0,25.

4.1.2.3 Syntéza *N'*-acylizonikotinohydrazidov (**15g-15q**) – Metóda č. 2

1 mmol (137,1 mg) INH **1** bol spoločne s 2 ekvivalentmi (2 mmol, 276,4 mg) uhličitanu draselného suspendovaný v 15 ml bezvodého THF. Reakčná zmes bola schladená na 0 °C a za stáleho miešania bol po kvapkách pridaný 1,1 ekvivalent (1,1 mmol) príslušného acylchloridu. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať do úplnej či prijateľnej konverzie (podľa TLC). Následne bol THF odparený na RVO a surový produkt bol suspendovaný v 10 ml demineralizovanej vody. pH vzniknutého roztoku bolo adjustované pomocou 0,5M roztoku kyseliny chlorovodíkovej na hodnotu približne 6. Reakčná zmes bola prevedená do deliaceho lieviku a bola dvakrát extrahovaná 15 ml etylacetátu. Organická vrstva bola sušená po dobu 15 minút bezvodým síranom sodným. Potom bolo sušidlo odfiltrované a filtrát bol odparený dosucha na RVO. Získaný produkt bol rekryštalizovaný z acetonitrilu.

***N'*-Oktanoylizonikotinohydrazid 15g.** Biela pevná látka; výťažok 94%; *T_f* 112,8-115,5 °C (>242 °C [53]). **IR:** 609, 614, 622, 628, 634, 637, 645, 649, 652, 656, 659, 678, 720, 758, 844, 874, 988, 1032, 1065, 1095, 1124, 1211, 1229, 1245, 1267, 1282, 1339, 1362, 1403, 1424, 1473, 1494, 1507, 1552, 1600 (ν CONH), 1647, 2852 (ν_s CH₂), 2921 (ν_s CH₃), 2931 (ν_{as} CH₂), 2950 (ν_{as} CH₃), 3035 (ν C-H arom.), 3202 (ν N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H₂, H₆), 7.74 – 7.71 (2H, m, H₃, H₅), 2.15 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.52 – 1.49 (2H, m, C³H₂), 1.27 – 1.20 (8H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂), 0.83 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.47, 150.93, 140.07, 121.84, 33.79, 31.72, 29.05, 28.98, 25.59, 22.60, 14.48. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₂₁N₃O₂ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96, nájdené C, 63.67; H, 8.11; N, 15.82. **R_f**: 0,27.

***N'*-Nonanoylizonikotinohydrazid 15h.** Biela pevná látka; výťažok 89%; *T_f* 113,1-114,4 °C. **IR:** 602, 631, 635, 640, 658, 669, 681, 719, 730, 754, 847, 874, 1063, 1092, 1122, 1219, 1240, 1254, 1270, 1340, 1402, 1473, 1507, 1495, 1551, 1599 (ν CONH), 1668, 1684, 1698, 2852 (ν_s CH₂), 2919 (ν_s CH₃), 2936 (ν_{as} CH₂), 2951 (ν_{as} CH₃), 3037 (ν C-H arom.), 3200 (ν N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.72 – 8.71 (2H, m, H₂, H₆), 7.74 – 7.71 (2H, m, H₃, H₅), 2.15 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.52 – 1.49 (2H, m, C³H₂), 1.28 – 1.20 (10H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂), 0.83 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.46, 150.93, 140.06, 121.83, 33.80, 31.79, 29.29, 29.14, 29.09, 25.59, 22.63, 14.49. **Elementárna analýza** pre C₁₅H₂₃N₃O₂ (277,37); výpočtom C, 64.96; H, 8.36; N, 15.15, nájdené C, 64.83; H, 8.47; N, 15.33. **R_f**: 0,28.

N'-Dekanoylizonikotinohydrazid 15i. Biela pevná látka; výťažok 92%; T_f 117,8-120,4 °C (118,4-119,2 °C [51]). **IR**: 618, 628, 635, 646, 653, 678, 721, 757, 850, 857, 994, 1067, 1162, 1202, 1226, 1257, 1290, 1411, 1471, 1502, 1552, 1594, 1602 (v CONH), 1636, 1676, 2852 (v_s CH₂), 2902 (v_s CH₃), 2923 (v_{as} CH₂), 2954 (v_{as} CH₃), 3016 (v C-H arom.), 3165 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.72 – 8.70 (2H, m, H2, H6), 7.74 – 7.71 (2H, m, H3, H5), 2.15 (t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.52 – 1.49 (2H, m, C³H₂), 1.30 – 1.18 (12H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂), 0.82 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.46, 150.93, 140.07, 121.83, 33.80, 31.83, 29.46, 29.34, 29.22, 29.09, 25.59, 22.64, 14.49. **Elementárna analýza** pre C₁₆H₂₅N₃O₂ (291,40); výpočtom C, 65.95; H, 8.65; N, 14.42, nájdené C, 65.83; H, 8.54; N, 14.57. **R_f**: 0,29.

N'-Undekanoylizonikotinohydrazid 15j. Biela pevná látka; výťažok 96%; T_f 119,3-122,8 °C. **IR**: 602, 605, 613, 624, 628, 640, 644, 648, 660, 680, 719, 730, 755, 848, 874, 1063, 1093, 1122, 1221, 1253, 1278, 1402, 1473, 1495, 1552, 1598 (v CONH), 2851 (v_s CH₂), 2919 (v_s CH₃), 2937 (v_{as} CH₂), 2949 (v_{as} CH₃), 3034 (v C-H arom.), 3201 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.72 – 8.71 (2H, m, H2, H6), 7.73 – 7.72 (2H, m, H3, H5), 2.14 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.53 – 1.48 (2H, m, C³H₂), 1.27 – 1.19 (14H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂), 0.82 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.05, 164.47, 150.92, 140.07, 121.84, 33.79, 31.84, 29.52, 29.50, 29.33, 29.25, 29.09, 25.59, 22.63, 14.49. **Elementárna analýza** pre C₁₇H₂₇N₃O₂ (305,42); výpočtom C, 66.85; H, 8.91; N, 13.76, nájdené C, 66.71; H, 8.84; N, 13.63. **R_f**: 0,30.

N'-Dodekanoylizonikotinohydrazid 15k. Biela pevná látka; výťažok 95%; T_f 119,9-122,6 °C (118-119 °C [54]). **IR**: 628, 633, 646, 679, 719, 760, 844, 877, 991, 1016, 1066, 1078, 1166, 1220, 1245, 1270, 1289, 1404, 1471, 1496, 1553, 1600 (v CONH), 1672, 2851 (v_s CH₂), 2889 (v_s CH₃), 2918 (v_{as} CH₂), 2944 (v_{as} CH₃), 3033 (v C-H arom.), 3205 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H2, H6), 7.73 – 7.71 (2H, m, H3, H5), 2.14 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.54 – 1.48 (2H, m, C³H₂), 1.29 – 1.16 (16H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂), 0.81 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.45, 150.93, 140.06, 121.83, 33.80, 31.84, 29.56, 29.54, 29.50, 29.33, 29.27, 29.09, 25.59, 22.64, 14.48. **Elementárna analýza** pre C₁₈H₂₉N₃O₂ (319,45); výpočtom C, 67.68; H, 9.15; N, 13.15, nájdené C, 67.52; H, 9.24; N, 13.27. **R_f**: 0,31.

N'-Tridekanoylizonikotinohydrazid 15l. Biela pevná látka; výťažok 97%; T_f 121,7-124,5 °C. **IR**: 630, 636, 643, 647, 650, 654, 658, 680, 711, 719, 730, 756, 848, 873, 990, 1064, 1095, 1121, 1219, 1242, 1263, 1284, 1339, 1363, 1403, 1464, 1473, 1496, 1507, 1551, 1598 (v CONH), 1668, 2850 (v_s CH₂), 2890 (v_s CH₃), 2919 (v_{as} CH₂), 2954 (v_{as} CH₃), 3032 (v C-H arom.), 3208 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.72 – 8.71 (2H, m, H2, H6), 7.74 – 7.71 (2H, m, H3, H5), 2.14 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.54 – 1.48 (2H, m, C³H₂), 1.29 – 1.15 (18H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂), 0.81 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.04, 164.45, 150.92, 140.07, 121.83, 33.79, 31.84, 29.60, 29.57, 29.55, 29.50, 29.33, 29.26, 29.09, 25.59, 22.63, 14.48. **Elementárna analýza**

pre C₁₉H₃₁N₃O₂ (333,48); výpočtom C, 68.43; H, 9.37; N, 12.60, nájdené C, 68.52; H, 9.46; N, 12.74. **R_f**: 0,36.

N'-Tetradekanoylizonikotinohydrazid 15m. Biela pevná látka, výťažok 99%; T_f 122,4-124,7 °C (194-197 °C [53]). **IR**: 602, 605, 621, 632, 646, 660, 670, 678, 720, 759, 844, 874, 995, 1066, 1086, 1160, 1214, 1235, 1256, 1277, 1404, 1471, 1496, 1553, 1602 (v CONH), 1714, 2850 (v_s CH₂), 2886 (v_s CH₃), 2918 (v_{as} CH₂), 2953 (v_{as} CH₃), 3040 (v C-H arom.), 3204 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.73 – 8.70 (2H, m, H₂, H₆), 7.73 – 7.71 (2H, m, H₃, H₅), 2.14 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.53 – 1.48 (2H, m, C³H₂), 1.29 – 1.15 (20H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂), 0.81 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 172.03, 164.45, 150.93, 140.06, 121.83, 33.79, 31.83, 29.60, 29.57, 29.55, 29.52, 29.50, 29.33, 29.26, 29.09, 25.59, 22.63, 14.48. **Elementárna analýza** pre C₂₀H₃₃N₃O₂ (347,50); výpočtom C, 69.13; H, 9.57; N, 12.09, nájdené C, 69.21; H, 9.49; N, 12.13. **R_f**: 0,33.

N'-Pentadekanoylizonikotinohydrazid 15n. Biela pevná látka; výťažok 89%; T_f 122,4-125,2 °C. **IR**: 602, 614, 632, 638, 645, 652, 659, 671, 678, 719, 730, 757, 849, 874, 1064, 1089, 1160, 1211, 1230, 1251, 1411, 1471, 1497, 1552, 1602 (v CONH), 2850 (v_s CH₂), 2889 (v_s CH₃), 2919 (v_{as} CH₂), 2951 (v_{as} CH₃), 3039 (v C-H arom.), 3201 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.59 (1H, s, NH), 9.94 (1H, s, NH), 8.76 – 8.73 (2H, m, H₂, H₆), 7.77 – 7.75 (2H, m, H₃, H₅), 2.18 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C²H₂), 1.57 – 1.51 (2H, m, C³H₂), 1.33 – 1.18 (22H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂), 0.84 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 171.95, 164.37, 150.84, 139.98, 121.76, 33.72, 31.76, 29.53, 29.51, 29.49, 29.47, 29.46, 29.43, 29.26, 29.18, 29.02, 25.52, 22.56, 14.41. **Elementárna analýza** pre C₂₁H₃₅N₃O₂ (361,53); výpočtom C, 69.77; H, 9.76; N, 11.62, nájdené C, 69.64; H, 9.65; N, 11.77. **R_f**: 0,35.

N'-Palmitoylizonikotinohydrazid 15o. Biela pevná látka; výťažok 94%; T_f 123,6-124,9 °C (124-126 °C [55]). **IR**: 605, 617, 624, 629, 632, 637, 642, 647, 651, 660, 664, 675, 685, 719, 738, 747, 761, 842, 859, 877, 1016, 1065, 1094, 1159, 1210, 1229, 1247, 1269, 1286, 1306, 1339, 1411, 1437, 1470, 1489, 1501, 1507, 1555, 1605 (v CONH), 1680, 1701, 2849 (v_s CH₂), 2890 (v_s CH₃), 2918 (v_{as} CH₂), 2955 (v_{as} CH₃), 3037 (v C-H arom.), 3212 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.60 (1H, s, NH), 9.95 (1H, s, NH), 8.76 – 8.73 (2H, m, H₂, H₆), 7.78 – 7.75 (2H, m, H₃, H₅), 2.18 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, C²H₂), 1.54 – 1.46 (2H, m, C³H₂), 1.31 – 1.12 (24H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂), 0.85 (3H, t, *J* = 6.7 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 171.67, 164.35, 150.57, 139.69, 121.50, 33.87, 33.45, 31.52, 29.30, 29.28, 29.24, 29.14, 29.03, 28.98, 28.94, 28.78, 25.27, 24.71, 22.32, 14.14. **Elementárna analýza** pre C₂₂H₃₇N₃O₂ (375,56); výpočtom C, 70.36; H, 9.93; N, 11.19, nájdené C, 70.24; H, 9.88; N, 11.26. **R_f**: 0,34.

N'-Heptadekanoylizonikotinohydrazid 15p. Biela pevná látka; výťažok 95%; T_f 124,7-126,1 °C. **IR**: 607, 614, 631, 638, 645, 652, 660, 682, 719, 732, 759, 850, 876, 1064, 1092, 1122, 1225, 1243, 1260, 1404, 1462, 1474, 1498, 1553, 1599 (v CONH), 1671, 2851 (v_s CH₂), 2891 (v_s CH₃), 2920 (v_{as} CH₂), 2953 (v_{as} CH₃), 3037 (v C-H arom.), 3201

(v N-H) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ 10.60 (1H, s, NH), 9.95 (1H, s, NH), 8.76 – 8.72 (2H, m, H2, H6), 7.77 – 7.75 (2H, m, H3, H5), 2.18 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, C^2H_2), 1.54 – 1.46 (2H, m, C^3H_2), 1.31 – 1.14 (26H, m, C^4H_2 , C^5H_2 , C^6H_2 , C^7H_2 , C^8H_2 , C^9H_2 , C^{10}H_2 , C^{11}H_2 , C^{12}H_2 , C^{13}H_2 , C^{14}H_2 , C^{15}H_2 , C^{16}H_2), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 126 MHz): δ 171.67, 164.35, 150.57, 139.69, 121.50, 33.87, 33.45, 31.52, 29.30, 29.28, 29.27, 29.24, 29.14, 29.03, 28.98, 28.94, 28.78, 25.27, 24.71, 22.32, 14.21. **Elementárna analýza** pre $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$ (389,58); výpočtom C, 70.91; H, 10.09; N, 10.79, nájdené C, 70.88; H, 10.12; N, 10.71. **R_f**: 0,22.

N'-Stearoylizonikotinohydrazid 15q. Biela pevná látka; výťažok 91%; T_f 122,6-124,8 °C (125-127 °C [55]). **IR**: 679, 719, 757, 828, 843, 874, 1066, 1122, 1163, 1222, 1237, 1255, 1308, 1404, 1472, 1497, 1553, 1600 (v CONH), 1667, 1716, 2850 (v_s CH_2), 2892 (v_s CH_3), 2918 (v_{as} CH_2), 2952 (v_{as} CH_3), 3037 (v C-H arom.), 3216 (v N-H) cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 10.69 (1H, s, NH), 9.99 (1H, s, NH), 8.84 – 8.79 (2H, m, H2, H6), 7.90 – 7.83 (2H, m, H3, H5), 2.18 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C^2H_2), 1.57 – 1.51 (2H, m, C^3H_2), 1.32 – 1.17 (28H, m, C^4H_2 , C^5H_2 , C^6H_2 , C^7H_2 , C^8H_2 , C^9H_2 , C^{10}H_2 , C^{11}H_2 , C^{12}H_2 , C^{13}H_2 , C^{14}H_2 , C^{15}H_2 , C^{16}H_2 , C^{17}H_2), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO, 126 MHz): δ 171.64, 163.64, 149.29, 141.03, 122.15, 33.84, 33.42, 31.48, 29.23, 29.21, 29.19, 29.17, 29.15, 29.09, 28.99, 28.93, 28.89, 28.74, 25.24, 24.67, 22.27, 14.11. **Elementárna analýza** pre $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2$ (403,32); výpočtom C, 71.42; H, 10.24; N, 10.41, nájdené C, 71.45; H, 10.30; N, 10.38. **R_f**: 0,3.

4.1.2.4 Syntéza modifikovaných *N'*-acylheteroarylhydrazidov (17a-17g)

2 mmol príslušnej karboxylovej kyseliny, 1 ekvivalent heteroarylhydrazidu (2 mmol) a 1,1 ekvivalentu 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBt; 2,2 mmol; 298,3 mg) sa za stáleho miešania rozpustilo alebo suspendovalo vo 20 ml DMF. Reakčná zmes bola ochladená zmesou ľad a voda na 0 °C a následne sa naraz pridalo 1,3 ekvivalentu *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-etylkarbodiimid hydrochloridu (EDC.HCl; 2,6 mmol; 498,4 mg). Reakčná zmes bola ponechaná reagovať po dobu 2 hodín pri 0 °C, a následne cez noc pri laboratórnej teplote. Rozpúšťadlo bolo odlúčené na RVO (40 °C, 11 mbar) a surový produkt bol rozpustený v 20 ml DCM. Reakčná zmes bola prevedená do deliaceho lieviku a extrahovaná 15 ml demineralizovanej vody, nasýteným roztokom hydrogénuhličitanu sodného (2 × 15 ml) a 15 ml nasýteného roztoku chloridu sodného. Organická fáza bola oddelená a vysušená bezvodým síranom sodným. Rozpúšťadlo bolo odparené na RVO, surový produkt bol prečistený kolónovou chromatografiou (MF: DCM + MeOH; 95:5 V/V) a následne kryštalizovaný z etylacetátu alebo acetonitrilu.

N'-(2-Etylhexanoyl)izonikotinohydrazid 17a. Svetlo žlté kryštály; výťažok 58%; T_f 136,0-136,4 °C. **IR**: 656, 694, 755, 853, 905, 967, 1003, 1119, 1165, 1247, 1266, 1411, 1465, 1490, 1518, 1652, 1665 (v CONH), 1690 (v CONH), 1702, 2858 (v_s CH_2), 2876 (v_s CH_3), 2932 (v_{as} CH_2), 2959 (v_{as} CH_3), 3050 (v C-H arom.), 3272 (v N-H) cm^{-1} . ^1H

NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.59 (1H, s, NH), 9.94 (1H, s, NH), 8.79 – 8.72 (2H, m, H₂, H₆), 7.81 – 7.74 (2H, m, H₃, H₅), 2.16 (1H, tt, $J = 9.5, 4.7$ Hz, C²H), 1.54 – 1.47 (2H, m, C¹H₂), 1.44 – 1.23 (6H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂), 0.90 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, C¹H₃), 0.86 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 174.36, 164.11, 150.55, 139.74, 121.50, 45.68, 32.05, 29.27, 25.77, 22.36, 14.09, 12.02. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₂₁N₃O₂ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96, nájdené C, 63.76; H, 8.05; N, 15.84. **R_f**: 0,48.

***N'*-(2-Metylheptanoyl)izonikotinohydrazid 17b.** Biela pevná látka; výťažok 58%; T_f 117,3-117,7 °C (122.2 -123.5 °C [51]). **IR**: 633, 647, 659, 841, 991, 1064, 1223, 1406, 1476, 1496, 1552, 1601 (v CONH), 2859 (v_s CH₂), 2876 (v_s CH₃), 2933 (v_{as} CH₂), 2958 (v_{as} CH₃), 3045 (v C-H arom.), 3188 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.57 (1H, s, NH), 9.90 (1H, s, NH), 8.74 – 8.69 (2H, m, H₂, H₆), 7.76 – 7.72 (2H, m, H₃, H₅), 2.38 – 2.29 (1H, m, C²H), 1.57 – 1.46 (2H, m, C³H₂), 1.31 – 1.14 (6H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂), 1.02 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, CH-CH₃), 0.83 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 175.57, 164.47, 150.93, 140.08, 121.83, 38.34, 34.19, 31.81, 26.99, 22.58, 18.40, 14.46. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₂₁N₃O₂ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96, nájdené C, 63.98; H, 8.11; N, 15.92. **R_f**: 0,44.

***N'*-(2-Propylpentanoyl)izonikotinohydrazid 17c.** Svetlo žlté kryštály; výťažok 56%; T_f 145,7-146,1 °C. **IR**: 660, 674, 751, 833, 848, 1066, 1126, 1219, 1248, 1286, 1408, 1473, 1497, 1553, 1603 (v CONH), 2856 (v_s CH₂), 2876 (v_s CH₃), 2930 (v_{as} CH₂), 2952 (v_{as} CH₃), 3050 (v C-H arom.), 3181 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.55 (1H, s, NH), 9.91 (1H, s, NH), 8.75 – 8.69 (2H, m, H₂, H₆), 7.76 – 7.71 (2H, m, H₃, H₅), 2.25 (1H, tt, $J = 9.2, 4.2$ Hz, C²H), 1.50 – 1.44 (4H, m, C³H₂, C³H₂), 1.35 – 1.24 (4H, m, C⁴H₂, C⁴H₂), 0.84 (6H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₃, C¹H₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 174.82, 164.48, 150.92, 140.09, 121.86, 43.82, 40.60, 35.30, 20.58, 14.55. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₂₁N₃O₂ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96, nájdené C, 63.74; H, 7.98; N, 15.97. **R_f**: 0,42.

(*E*)-*N'*-(Okt-2-enoyl)izonikotinohydrazid 17d. Biela pevná látka; výťažok 53%; T_f 126,7-127,3 °C. **IR**: 640, 678, 757, 850, 894, 976, 1166, 1286 ($\delta = \text{CH-}$), 1468, 1500, 1551, 1581, 1654 (v CONH), 2858 (v_s CH₂), 2874 (v_s CH₃), 2929 (v_{as} CH₂), 2958 (v_{as} CH₃), 3020 (v =CH-), 3051 (v C-H arom.), 3153 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.66 (1H, s, NH), 10.05 (1H, s, NH), 8.75 – 8.70 (2H, m, H₂, H₆), 7.77 – 7.71 (2H, m, H₃, H₅), 6.74 (1H, dt, $J = 15.5, 7.0$ Hz, C²H=C³H), 5.98 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, C²H=C³H), 2.19 – 2.12 (2H, m, C⁴H₂), 1.40 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, C⁵H₂), 1.32 – 1.20 (4H, m, C⁶H₂, C⁷H₂), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 164.75, 164.49, 150.96, 145.49, 140.03, 122.25, 121.84, 31.87, 31.33, 27.91, 22.44, 14.42. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O₂ (261,33); výpočtom C, 64.35; H, 7.33; N, 16.08; nájdené C, 64.47; H, 7.21; N, 16.23. **R_f**: 0,40.

***N'*-(Okt-7-enoyl)izonikotinohydrazid 17e.** Svetlo hnedá pevná látka; výťažok 59%; T_f 84,4-84,7 °C. **IR**: 637, 680, 757, 846, 876, 931 ($\delta -\text{CH}=\text{CH}_2$), 996 ($\delta -\text{CH}=\text{CH}_2$), 1209, 1243, 1270, 1404, 1426, 1468, 1495, 1553, 1601 (v CONH), 2880 (v_s CH₂), 2937 (v_{as} CH₂), 2980 (v_s =CH₂), 3077 (v_{as} =CH₂), 3198 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 10.56 (1H, s, NH), 9.91 (1H, s, NH), 8.76 – 8.70 (2H, m, H₂, H₆), 7.75 – 7.71 (2H, m, H₃,

H5), 5.77 (1H, ddt, $J = 16.9, 10.2, 6.6$ Hz, $-C^7H=C^8H_2$), 4.97 (1H, dd, $J = 17.2, 2.0$ Hz, C^8H^E), 4.91 (1H, dd, $J = 10.0, 2.1$ Hz, C^8H^Z), 2.15 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C^2H_2), 1.99 (2H, q, $J = 7.1$ Hz, C^6H_2), 1.53 (2H, p, $J = 7.4$ Hz, C^3H_2), 1.37 – 1.25 (4H, m, C^4H_2, C^5H_2). ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz): δ 172.02, 164.48, 150.93, 140.06, 139.29, 121.84, 115.27, 33.73, 33.61, 28.60, 28.56, 25.42. **Elementárna analýza** pre $C_{14}H_{19}N_3O_2$ (261,33); výpočtom C, 64.35; H, 7.33; N, 16.08; nájdené C, 64.22; H, 7.45; N, 16.10. **R_f**: 0,39.

***N*'-Oktanoylnikotinohydrazid 17f.** Biele kryštály; výtťažok 65%; T_f 108,9-109,1 °C. **IR**: 621, 648, 698, 713, 838, 872, 1027, 1166, 1197, 1211, 1237, 1412, 1425, 1467, 1490, 1568, 1595, 1635 (v CONH), 2853 (v_s CH₂), 2875 (v_s CH₃), 2924 (v_{as} CH₂), 2954 (v_{as} CH₃), 3018 (v C-H arom), 3167 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.49 (1H, s, NH), 9.91 (1H, s, NH), 9.02 – 8.99 (1H, m, H6), 8.74 – 8.70 (1H, m, H3), 8.20 – 8.16 (1H, m, H4), 7.54 – 7.51 (1H, m, H5), 2.18 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C^2H_2), 1.55 (2H, p, $J = 7.2$ Hz, C^3H_2), 1.35 – 1.18 (8H, m, $C^4H_2, C^5H_2, C^6H_2, C^7H_2$), 0.87 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 171.79, 164.29, 152.62, 148.62, 135.38, 128.40, 123.83, 33.46, 31.40, 28.73, 28.67, 25.28, 22.28, 14.17. **Elementárna analýza** pre $C_{14}H_{21}N_3O_2$ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96; nájdené C, 63.71; H, 8.13; N, 15.87. **R_f**: 0,40.

***N*'-Oktanoylpikolinohydrazid 17g.** Číry bezfarebný olej; výtťažok 65%. **IR**: 625, 636, 679, 721, 753, 822, 911, 1002, 1042, 1089, 1106, 1162, 1240, 1290, 1435, 1467, 1505, 1570, 1593, 1655 (CONH), 1712 (CONH), 2855 (v_s CH₂), 2874 (v_s CH₃), 2931 (v_{as} CH₂), 2954 (v_{as} CH₃), 3022 (v C-H arom.), 3227 (v N-H) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 10.37 (1H, s, NH), 9.95 (1H, s, NH), 8.70 – 8.63 (1H, m, H3), 8.06 – 7.97 (2H, m, H4, H6), 7.69 – 7.59 (1H, m, H5), 2.16 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C^2H_2), 1.54 (2H, p, $J = 7.3$ Hz, C^3H_2), 1.35 – 1.19 (8H, m, $C^4H_2, C^5H_2, C^6H_2, C^7H_2$), 0.86 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 171.47, 163.03, 149.65, 149.07, 138.28, 127.38, 122.74, 33.71, 31.66, 28.97, 28.95, 25.53, 22.54, 14.43. **Elementárna analýza** pre $C_{14}H_{21}N_3O_2$ (263,34); výpočtom C, 63.85; H, 8.04; N, 15.96; nájdené C, 63.73; H, 8.16; N, 16.01. **R_f**: 0,64.

4.1.2.5 Syntéza 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov (**16a-16q**; **18a-18g**)

0,5 mmol príslušného *N*'-acylheteroarylhydrazidu bolo suspendovaných v 50 ml DCM. Za stáleho miešania sa pridali 3 ekvivalenty (1,5 mmol; 286,5 mg) *p*-toluénsulfonylchloridu, a následne bolo po kvapkách pridaných 5 ekvivalentov (2,5 mmol, 348 μ l) trietylamínu. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať do prijateľnej konverzie (podľa TLC). DCM bol odparený na RVO a surový produkt bol suspendovaný v etylacetáte. Vyzrážaný trietylamónium chlorid bol odfiltrovaný a filtrát sa odparil dosucha. Surový produkt bol prečistený kolónovou chromatografiou (MF: DCM + MeOH; 97,5:2,5 v/v pre **16a-16q** a 99:1 v/v pre **18a-18g**) a následne kryštalizovaný z etylacetátu.

2-Metyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16a. Žltohnedé kryštály, výtťažok 77%, T_f 151,2-153,2 °C (148-150 °C [56]). **IR**: 666, 675, 707, 721, 739, 840, 959, 970, 988, 996,

1042, 1062, 1099 (ν_s C-O-C), 1217, 1248, 1357, 1415 (ν_{as} C-O-C), 1436, 1484, 1499, 1539, 1566 (ν C=N), 1579, 1610, 2950 (ν_s CH₃), 2996 (ν_{as} CH₃), 3049 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.78 – 8.75 (2H, m, H₂, H₆), 7.89 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.58 (3H, s, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 165.59, 163.02, 151.51, 131.10, 120.56, 11.25. **Elementárna analýza** pre C₈H₇N₃O (161,16); výpočtom C, 59.62; H, 4.38; N, 26.07, nájdené C, 59.77; H, 4.26; N, 26.14. **R_f**: 0,34.

2-Etyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16b. Svetlooranžové kryštály; výťažok 84%; T_f 66,1-68,3 °C (75 °C [57]). **IR**: 616, 632, 635, 653, 669, 707, 714, 742, 802, 843, 970, 998, 1029, 1062, 1069, 1104 (ν_s C-O-C), 1215, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1542, 1565 (ν C=N), 1581, 1609, 2928 (ν_s CH₂), 2948 (ν_s CH₃), 2987 (ν_{as} CH₂), 2994 (ν_{as} CH₃), 3050 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.80 – 8.74 (2H, m, H₂, H₆), 7.89 – 7.84 (2H, m, H₃, H₅), 2.94 (2H, q, *J* = 7.6 Hz, CH₂), 1.30 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 169.33, 162.93, 151.49, 131.15, 120.61, 19.01, 10.86. **Elementárna analýza** pre C₉H₉N₃O (175,19); výpočtom C, 61.70; H, 5.18; N, 23.99, nájdené C, 61.58; H, 5.15; N, 23.95. **R_f**: 0,34.

2-Propyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16c. Svetlohnedé kryštály; výťažok 89%; T_f 49,2-51,7 °C. **IR**: 676, 691, 706, 738, 748, 833, 969, 988, 1019, 1092 (ν_s C-O-C), 1194, 1216, 1413 (ν_{as} C-O-C), 1490, 1539, 1557 (ν C=N), 1575, 1608, 2851 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2830 (ν_{as} CH₂), 2965 (ν_{as} CH₃), 3042 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.80 – 8.76 (2H, m, H₂, H₆), 7.89 – 7.85 (2H, m, H₃, H₅), 2.90 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, C¹H₂), 1.80 – 1.72 (2H, m, C²H₂), 0.95 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.31, 162.95, 151.49, 131.13, 120.62, 27.00, 19.86, 13.87. **Elementárna analýza** pre C₁₀H₁₁N₃O (189,22); výpočtom C, 63.48; H, 5.86; N, 22.21, nájdené C, 63.32; H, 5.77; N, 22.30. **R_f**: 0,32.

2-Butyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16d. Svetložlté kryštály; výťažok 71%; T_f 45,8-47,5 °C. **IR**: 690, 707, 732, 740, 746, 755, 838, 968, 988, 1024, 1097 (ν_s C-O-C), 1193, 1214, 1412 (ν_{as} C-O-C), 1439, 1478, 1541, 1560 (ν C=N), 1577, 1609, 2858 (ν_s CH₂), 2876 (ν_s CH₃), 2941 (ν_{as} CH₂), 2959 (ν_{as} CH₃), 3043 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.87 – 7.85 (2H, m, H₃, H₅), 2.92 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, C¹H₂), 1.75 – 1.68 (2H, m, C²H₂), 1.40 – 1.32 (2H, m, C³H₂), 0.88 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.45, 162.93, 151.49, 131.12, 120.61, 28.34, 24.85, 22.03, 13.98. **Elementárna analýza** pre C₁₁H₁₃N₃O (203,25); výpočtom C, 65.01; H, 6.45; N, 20.68, nájdené C, 65.06; H, 6.49; N, 20.73. **R_f**: 0,31.

2-Pentyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16e. Svetlohnedé kryštály; výťažok 88%; T_f 49,9-52,4 °C. **IR**: 693, 705, 727, 734, 741, 745, 767, 833, 897, 967, 989, 1006, 1023, 1046, 1065, 1097 (ν_s C-O-C), 1188, 1220, 1250, 1417 (ν_{as} C-O-C), 1455, 1471, 1490, 1541, 1562 (ν C=N), 1577, 1609, 2856 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2932 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 2964, 3051 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.87 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, C¹H₂), 1.77 – 1.71 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.26 (4H, m, C³H₂, C⁴H₂), 0.84 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.47, 162.93, 151.50, 131.13, 120.61, 31.03, 25.95, 25.11, 22.18, 14.29. **Elementárna analýza** pre C₁₂H₁₅N₃O (217,27); výpočtom C, 66.34; H, 6.96; N, 19.34, nájdené C, 66.42; H, 6.87; N, 19.30. **R_f**: 0,28.

2-Hexyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16f. Svetložlté kryštály; výťažok 78%; T_f 46,9-49,4 °C. **IR:** 694, 704, 733, 741, 753, 798, 967, 989, 1024, 1065, 1098 (ν_s C-O-C), 1187, 1219, 1417 (ν_{as} C-O-C), 1644, 1479, 1541, 1563 (ν C=N), 1577, 1609, 2855 (ν_s CH₂), 2872 (ν_s CH₃), 2932 (ν_{as} CH₂), 2956 (ν_{as} CH₃), 3054 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.76 (2H, m, H₂, H₆), 7.88 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.77 – 1.69 (2H, m, C²H₂), 1.38 – 1.30 (2H, m, C³H₂), 1.30 – 1.21 (4H, m, C⁴H₂, C⁵H₂), 0.83 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.46, 162.93, 151.50, 131.12, 120.60, 31.27, 28.50, 26.22, 25.15, 22.44, 14.40. **Elementárna analýza** pre C₁₃H₁₇N₃O (231,30); výpočtom C, 67.51; H, 7.31; N, 18.27, nájdené C, 67.46; H, 7.29; N, 18.32. **R_f**: 0,26.

2-Heptyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16g. Biele kryštály; výťažok 83%; T_f 61,4-63,8 °C. **IR:** 694, 704, 722, 741, 751, 833, 976, 989, 1015, 1035, 1098 (ν_s C-O-C), 1186, 1218, 1230, 1272, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1472, 1490, 1540, 1562 (ν C=N), 1578, 1608, 2853 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2921 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3050 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.76 (2H, m, H₂, H₆), 7.88 – 7.85 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.5 Hz, C¹H₂), 1.76 – 1.69 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.18 (8H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂), 0.81 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.46, 162.93, 151.50, 131.12, 120.61, 31.59, 28.80, 28.72, 26.27, 25.14, 22.55, 14.43. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.49; H, 7.75; N, 17.22. **R_f**: 0,24.

2-Oktyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16h. Biele kryštály; výťažok 79%; T_f 61,3-63,1 °C. **IR:** 659, 704, 722, 731, 741, 756, 748, 833, 967, 989, 1025, 1098 (ν_s C-O-C), 1186, 1228, 1261, 1419 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1473, 1541, 1564 (ν C=N), 1579, 1608, 2852 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2919 (ν_{as} CH₂), 2955 (ν_{as} CH₃), 3052 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.80 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.88 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.5 Hz, C¹H₂), 1.75 – 1.69 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.17 (10H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂), 0.81 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.47, 162.93, 151.49, 131.14, 120.62, 31.74, 29.16, 29.08, 29.02, 26.26, 25.14, 22.59, 14.46. **Elementárna analýza** pre C₁₅H₂₁N₃O (259,35); výpočtom C, 69.47; H, 8.16; N, 16.20, nájdené C, 69.34; H, 8.03; N, 16.15. **R_f**: 0,22.

2-Nonyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16i. Biele kryštály; výťažok 76%; T_f 72,2-74,7 °C. **IR:** 609, 638, 649, 659, 675, 695, 704, 720, 743, 753, 776, 822, 834, 917, 967, 989, 1021, 1065, 1098 (ν_s C-O-C), 1169, 1185, 1226, 1252, 1273, 1311, 1370, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1465, 1472, 1541, 1565 (ν C=N), 1579, 1608, 1647, 1706, 2849 (ν_s CH₂), 2868 (ν_s CH₃), 2919 (ν_{as} CH₂), 2954 (ν_{as} CH₃), 3048 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.88 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.75 – 1.70 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.16 (12H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂), 0.79 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.46, 162.93, 151.50, 131.13, 120.61, 31.78, 29.31, 29.15, 29.06, 28.81, 26.25, 25.14, 22.61, 14.45. **Elementárna analýza** pre C₁₆H₂₃N₃O (273,38); výpočtom C, 70.30; H, 8.48; N, 15.37, nájdené C, 70.45; H, 8.56; N, 15.49. **R_f**: 0,26.

2-Decyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16j. Biele kryštály; výťažok 84%; T_f 69,9-71,6 °C. **IR:** 695, 704, 720, 733, 742, 751, 795, 833, 967, 989, 1025, 1065, 1098

(ν_s C-O-C), 1184, 1220, 1243, 1303, 1397, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1472, 1541, 1564 (ν C=N), 1578, 1609, 2849 (ν_s CH₂), 2872 (ν_s CH₃), 2918 (ν_{as} CH₂), 2955 (ν_{as} CH₃), 3054 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.79 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.87 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.6 Hz, C¹H₂), 1.76 – 1.69 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.15 (14H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂), 0.80 (3H, t, J = 6.9 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.46, 162.92, 151.50, 131.12, 120.60, 31.81, 29.45, 29.35, 29.20, 29.04, 28.80, 26.25, 25.14, 22.61, 14.46. **Elementárna analýza** pre C₁₇H₂₅N₃O (287,41); výpočtom C, 71.04; H, 8.77; N, 14.62, nájdené C, 71.16; H, 8.83; N, 14.54. **R_f**: 0,28.

2-Undecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16k. Biele kryštály; výťažok 71%; T_f 79,0-81,2 °C. **IR**: 694, 704, 720, 730, 741, 753, 777, 832, 967, 989, 1011, 1025, 1064, 1098 (ν_s C-O-C), 1183, 1226, 1238, 1344, 1396, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1472, 1494, 1540, 1565 (ν C=N), 1577, 1608, 2848 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2915 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3053 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.78 – 8.77 (2H, m, H₂, H₆), 7.88 – 7.86 (2H, m, H₃, H₅), 2.91 (2H, t, J = 7.5 Hz, C¹H₂), 1.76 – 1.69 (2H, m, C²H₂), 1.36 – 1.15 (16H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂), 0.80 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.48, 162.93, 151.48, 131.15, 120.63, 31.81, 29.50, 29.49, 29.34, 29.23, 29.03, 28.79, 26.24, 25.14, 22.61, 14.47. **Elementárna analýza** pre C₁₈H₂₇N₃O (301,43); výpočtom C, 71.72; H, 9.03; N, 13.94, nájdené C, 71.64; H, 8.95; N, 13.87. **R_f**: 0,31.

2-Dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16l. Biele kryštály; výťažok 94%; T_f 77,2-78,9 °C (75-76 °C [58]). **IR**: 613, 627, 638, 652, 661, 695, 704, 719, 729, 742, 751, 763, 832, 967, 989, 1023, 1065, 1099 (ν_s C-O-C), 1182, 1205, 1233, 1383, 1397, 1417 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1473, 1494, 1541, 1565 (ν C=N), 1609, 2849 (ν_s CH₂), 2872 (ν_s CH₃), 2917 (ν_{as} CH₂), 2955 (ν_{as} CH₃), 3052 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.83 – 8.80 (2H, m, H₂, H₆), 7.90 – 7.88 (2H, m, H₃, H₅), 2.95 (2H, t, J = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.82 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.43 – 1.22 (18H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂), 0.85 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 167.84, 162.31, 150.83, 130.57, 119.96, 31.14, 28.85, 28.84, 28.79, 28.65, 28.52, 28.34, 28.14, 25.62, 24.53, 21.90, 13.72. **Elementárna analýza** pre C₁₉H₂₉N₃O (315,46); výpočtom C, 72.34; H, 9.27; N, 13.32, nájdené C, 72.41; H, 9.39; N, 13.21. **R_f**: 0,35.

2-Tridecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16m. Perleťové kryštály; výťažok 79%; T_f 84,9-87,1 °C. **IR**: 694, 704, 720, 730, 741, 748, 755, 779, 833, 966, 989, 1016, 1029, 1064, 1099 (ν_s C-O-C), 1182, 1202, 1229, 1278, 1417 (ν_{as} C-O-C), 1472, 1540, 1564 (ν C=N), 1579, 1607, 2848 (ν_s CH₂), 2869 (ν_s CH₃), 2916 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3050 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.82 – 8.79 (2H, m, H₂, H₆), 7.90 – 7.87 (2H, m, H₃, H₅), 2.95 (2H, t, J = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.83 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.43 – 1.19 (20H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂), 0.85 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 167.76, 162.25, 150.74, 130.53, 119.88, 31.05, 28.78, 28.76, 28.74, 28.69, 28.55, 28.42, 28.25, 28.06, 25.55, 24.46, 21.80, 13.59. **Elementárna analýza** pre C₂₀H₃₁N₃O (329,49); výpočtom C, 72.91; H, 9.48; N, 12.75, nájdené C, 72.84; H, 9.39; N, 12.63. **R_f**: 0,36.

2-Tetradecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16n. Biele kryštály; výťažok 72%; T_f 83,0-85,7 °C. **IR:** 695, 704, 719, 742, 752, 766, 793, 833, 967, 990, 1022, 1035, 1064, 1100 (ν_s C-O-C), 1181, 1200, 1226, 1248, 1270, 1383, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1473, 1495, 1541, 1566 (ν C=N), 1579, 1608, 2849 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2917 (ν_{as} CH₂), 2955 (ν_{as} CH₃), 3052 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.82 – 8.79 (2H, m, H2, H6), 7.90 – 7.87 (2H, m, H3, H5), 2.95 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C¹H₂), 1.82 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.43 – 1.21 (22H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂), 0.85 (3H, t, $J = 6.8$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 168.38, 162.86, 151.36, 131.15, 120.50, 31.66, 29.39, 29.37, 29.36, 29.34, 29.31, 29.17, 29.03, 28.86, 28.68, 26.16, 25.08, 22.42, 14.21. **Elementárna analýza** pre C₂₁H₃₃N₃O (343,52); výpočtom C, 73.43; H, 9.68; N, 12.23, nájdené C, 73.58; H, 9.78; N, 12.37. **R_f**: 0,43.

2-Pentadecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16o. Biele kryštály; výťažok 85%; T_f 88,7-90,3 °C (121,1-122,2 °C [42]). **IR:** 695, 704, 720, 731, 742, 750, 781, 832, 966, 989, 1022, 1064, 1100 (ν_s C-O-C), 1181, 1198, 1226, 1243, 1264, 1303, 1397, 1419 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1472, 1494, 1541, 1566 (ν C=N), 1578, 1608, 2848 (ν_s CH₂), 2868 (ν_s CH₃), 2916 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3051 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.82 – 8.80 (2H, m, H2, H6), 7.90 – 7.87 (2H, m, H3, H5), 2.95 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C¹H₂), 1.82 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.44 – 1.23 (24H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂), 0.86 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 167.74, 162.23, 150.73, 130.52, 119.86, 31.04, 28.76, 28.75, 28.74, 28.73, 28.72, 28.68, 28.54, 28.40, 28.23, 28.05, 25.53, 24.45, 21.79, 13.57. **Elementárna analýza** pre C₂₂H₃₅N₃O (357,54); výpočtom C, 73.91; H, 9.87; N, 11.75, nájdené C, 73.96; H, 9.95; N, 11.62. **R_f**: 0,45.

2-Hexadecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16p. Biele kryštály; výťažok 84%; T_f 87,7-88,3 °C. **IR:** 695, 704, 720, 731, 741, 753, 769, 793, 833, 848, 966, 989, 1024, 1065, 1100 (ν_s C-O-C), 1180, 1196, 1226, 1238, 1259, 1398, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1473, 1490, 1507, 1540, 1559, 1565 (ν C=N), 1578, 1608, 1683, 2848 (ν_s CH₂), 2869 (ν_s CH₃), 2917 (ν_{as} CH₂), 2954 (ν_{as} CH₃), 3053 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.82 – 8.79 (2H, m, H2, H6), 7.90 – 7.87 (2H, m, H3, H5), 2.95 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, C¹H₂), 1.82 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.43 – 1.23 (26H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂), 0.86 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 126 MHz): δ 167.74, 162.23, 150.73, 130.52, 119.86, 31.04, 28.77, 28.76, 28.75, 28.74, 28.73, 28.72, 28.68, 28.54, 28.40, 28.23, 28.05, 25.53, 24.45, 21.79, 13.57. **Elementárna analýza** pre C₂₃H₃₇N₃O (371,57); výpočtom C, 74.35; H, 10.04; N, 11.31, nájdené C, 74.44; H, 10.11; N, 11.16. **R_f**: 0,5.

2-Heptadecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 16q. Biele kryštály; výťažok 83%; T_f 94,7-96,1 °C (112,2-113,1 °C [42]). **IR:** 674, 695, 704, 720, 731, 741, 751, 760, 807, 833, 966, 989, 1026, 1064, 1097 (ν_s C-O-C), 1180, 1194, 1226, 1254, 1397, 1418 (ν_{as} C-O-C), 1464, 1472, 1495, 1541, 1565 (ν C=N), 1578, 1608, 2848 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2916 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3051 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.82 – 8.80 (2H, m, H2, H6), 7.90 – 7.88 (2H, m, H3, H5), 2.95 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C¹H₂), 1.82 – 1.75 (2H, m, C²H₂), 1.43 – 1.19 (28H, m, C³H₂, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂, C⁷H₂, C⁸H₂, C⁹H₂, C¹⁰H₂, C¹¹H₂, C¹²H₂, C¹³H₂, C¹⁴H₂, C¹⁵H₂, C¹⁶H₂), 0.86 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (DMSO, 126 MHz): δ 168.38, 162.86, 151.36, 131.16, 120.50, 31.67, 29.39, 29.38, 29.37, 29.36, 29.35, 29.34, 29.32, 29.30, 29.16, 29.03, 28.86, 28.68, 26.16, 25.08, 22.42, 14.22. **Elementárna analýza** pre C₂₄H₃₉N₃O (385,60); výpočtom C, 74.76; H, 10.20; N, 10.90, nájdené C, 74.79; H, 10.14; N, 11.02. **R_f**: 0,59.

2-(Heptan-3-yl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 18a. Hnedá polotuhá látka; výt'azok 93%. **IR**: 640, 681, 701, 731, 750, 834, 935, 968, 990, 1010, 1065, 1094 (ν_s C-O-C), 1231, 1342, 1379, 1415 (ν_{as} C-O-C), 1463, 1485, 1542, 1555 (ν C=N), 1610, 1638, 2856 (ν_s CH₂), 2872 (ν_s CH₃), 2935 (ν_{as} CH₂), 2951 (ν_{as} CH₃), 3051 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.83 – 8.79 (2H, m, H2, H6), 7.96 – 7.92 (2H, m, H3, H5), 3.01 (1H, p, J = 6.7 Hz, CH), 1.79 – 1.64 (4H, m, C²H₂, C'²H₂), 1.27 – 1.14 (4H, m, C³H₂, C⁴H₂), 0.84 – 0.79 (6H, m, CH₃, C'H₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 170.76, 162.88, 150.86, 131.79, 120.99, 38.55, 32.15, 29.21, 26.01, 22.45, 14.29, 11.85. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.64; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.79; H, 7.91; N, 17.23. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,29.

2-(Heptan-2-yl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 18b. Hnedá polotuhá látka; výt'azok 85%. **IR**: 681, 729, 748, 819, 832, 969, 1010, 1031, 1095 (ν_s C-O-C), 1122, 1172, 1237, 1415 (ν_{as} C-O-C), 1459, 1487, 1509, 1552 (ν C=N), 1600, 1640, 2858 (ν_s CH₂), 2874 (ν_s CH₃), 2933 (ν_{as} CH₂), 2952 (ν_{as} CH₃), 3052 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.83 – 8.77 (2H, m, H2, H6), 7.93 – 7.87 (2H, m, H3, H5), 3.16 (1H, h, J = 7.0 Hz, CH), 1.80 – 1.74 (2H, m, C²H₂), 1.64 – 1.57 (2H, m, C³H₂), 1.32 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH-CH₃), 1.27 – 1.20 (4H, m, C⁴H₂, C⁵H₂), 0.80 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 171.61, 162.83, 151.23, 131.43, 120.78, 34.40, 31.52, 31.36, 26.45, 22.43, 18.16, 14.38. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.79; H, 7.63; N, 17.05. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,25.

2-(Heptan-4-yl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 17c. Hnedá olejovitá látka; výt'azok 74%. **IR**: 653, 679, 704, 742, 831, 967, 989, 1011, 1065, 1095 (ν_s C-O-C), 1254, 1380, 1414 (ν_{as} C-O-C), 1465, 1488, 1542, 1556 (ν C=N), 1610, 2855 (ν_s CH₂), 2873 (ν_s CH₃), 2933 (ν_{as} CH₂), 2959 (ν_{as} CH₃), 3050 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.81 – 8.77 (2H, m, H2, H6), 7.92 – 7.88 (2H, m, H3, H5), 3.09 (1H, tt, J = 8.7, 5.7 Hz, C¹H), 1.75 – 1.60 (4H, m, C²H₂, C'²H₂), 1.29 – 1.15 (4H, m, C³H₂, C'³H₂), 0.82 (6H, t, J = 7.3 Hz, CH₃, C'H₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 170.77, 162.93, 151.27, 131.34, 120.78, 36.56, 35.06, 20.29, 14.20. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.41; H, 7.63; N, 17.21. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,31.

(E)-2-(Hept-1-én-1-yl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 18d. Hnedá olejovitá látka; výt'azok 78%. **IR**: 644, 694, 711, 730, 832, 968, 990, 1010, 1064, 1100 (ν_s C-O-C), 1177, 1216, 1268, 1379, 1415 (ν_{as} C-O-C), 1467, 1488, 1523, 1540, 1566 (ν C=N), 1573, 1611, 1660, 1716, 2859 (ν_s CH₂), 2872 (ν_s CH₃), 2931 (ν_{as} CH₂), 2956 (ν_{as} CH₃), 3023 (ν =CH-), 3054 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.82 – 8.76 (2H, m, H2, H6), 7.96 – 7.90 (2H, m, H3, H5), 6.97 (1H, dt, J = 16.1, 7.0 Hz, C¹H=C²H), 6.56 (1H, dt, J = 16.1, 1.7 Hz, C¹H=C²H), 2.29 (2H, qd, J = 7.2, 1.6 Hz, C³H₂), 1.46 (2H, p, J = 7.5 Hz, C⁴H₂), 1.30 – 1.24 (4H, m, C⁵H₂, C⁶H₂), 0.84 (3H, t, J = 7.0 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 164.67, 162.13, 151.30, 145.90, 131.14, 120.78, 112.90, 32.74, 31.30, 27.90,

22.42, 14.39. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₇N₃O (243,31); výpočtom 69.11; H, 7.04; N, 17.27, nájdené C, 69.05; H, 7.17; N, 17.13. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,25.

2-(Hept-6-én-1-yl)-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol 18e. Hnedá olejovitá látka; výťažok 83%. **IR**: 635, 691, 708, 731, 826, 832, 913, 966, 990, 999, 1014, 1097 (ν_s C-O-C), 1182, 1213, 1228, 1411 (ν_{as} C-O-C), 1471, 1539, 1562 (ν C=N), 1579, 2858 (ν_s CH₂), 2922 (ν_{as} CH₂), 2982 (ν_s =CH₂), 3043 (ν C-H arom.), 3077 (ν_{as} =CH₂) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.81 – 8.75 (2H, m, H₂, H₆), 7.90 – 7.83 (2H, m, H₃, H₅), 5.75 (1H, ddt, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, C⁶H=C⁷H₂), 4.96 (1H, dq, *J* = 17.3, 1.8 Hz, C⁷H^E), 4.89 (1H, dq, *J* = 10.3, 2.0 Hz, C⁷H^Z), 2.92 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.99 (2H, q, *J* = 6.7 Hz, C²H₂), 1.74 (2H, p, *J* = 7.4 Hz, C³H₂), 1.41 – 1.33 (4H, m, C⁴H₂, C⁵H₂). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.43, 162.93, 151.47, 139.15, 131.15, 120.62, 115.32, 33.48, 28.31, 28.27, 26.09, 25.11. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₇N₃O (243,31); výpočtom 69.11; H, 7.04; N, 17.27, nájdené C, 69.24; H, 7.13; N, 17.28. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,35.

2-Heptyl-5-(pyridín-3-yl)-1,3,4-oxadiazol 18f. Hnedá pevná látka; výťažok 85%; T_f 41,1-41,5 °C. **IR**: 621, 708, 721, 753, 814, 821, 965, 1009, 1020, 1089 (ν_s C-O-C), 1185, 1427 (ν_{as} C-O-C), 1471, 1547, 1556 (ν C=N), 1587, 1604, 2857 (ν_s CH₂), 2870 (ν_s CH₃), 2920 (ν_{as} CH₂), 2952 (ν_{as} CH₃), 3051 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 9.13 – 9.09 (1H, m, H₂), 8.77 – 8.73 (1H, m, H₆), 8.33 – 8.29 (1H, m, H₄), 7.62 – 7.58 (1H, m, H₅), 2.90 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, C¹H₂), 1.73 (2H, p, *J* = 7.6 Hz, C²H₂), 1.36 – 1.31 (2H, m, C³H₂), 1.29 – 1.21 (6H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂), 0.82 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 167.91, 162.60, 152.78, 147.52, 134.66, 124.94, 120.71, 31.60, 28.80, 28.73, 26.31, 25.10, 22.56, 14.44. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.65; H, 7.74; N, 17.06. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,20.

2-Heptyl-5-(pyridín-2-yl)-1,3,4-oxadiazol 18g. Biele kryštály; výťažok 82%; T_f 52,3-52,7 °C. **IR**: 640, 708, 723, 744, 754, 770, 793, 899, 968, 1015, 1030, 1102 (ν_s C-O-C), 1191, 1252, 1394, 1428 (ν_{as} C-O-C), 1442, 1459, 1473, 1556 (ν C=N), 1568, 1593, 2858 (ν_s CH₂), 2871 (ν_s CH₃), 2939 (ν_{as} CH₂), 2953 (ν_{as} CH₃), 3052 (ν C-H arom.) cm⁻¹. **¹H NMR** (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ 8.74 – 8.70 (1H, m, H₆), 8.12 – 8.09 (1H, m, H₃), 8.03 – 7.98 (1H, m, H₄), 7.61 – 7.59 (1H, m, H₅), 2.91 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, C¹H₂), 1.72 (2H, p, *J* = 7.5 Hz, C²H₂), 1.35 – 1.29 (2H, m, C³H₂), 1.30 – 1.18 (6H, m, C⁴H₂, C⁵H₂, C⁶H₂), 0.81 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃). **¹³C NMR** (DMSO, 151 MHz): δ 168.24, 164.03, 150.76, 143.51, 138.39, 126.75, 123.28, 31.60, 28.81, 28.72, 26.37, 25.14, 22.55, 14.44. **Elementárna analýza** pre C₁₄H₁₉N₃O (245,33); výpočtom C, 68.54; H, 7.81; N, 17.13, nájdené C, 68.49; H, 7.75; N, 17.26. **R_f** (DCM + MeOH; 99:1 ^{v/v}): 0,4.

4.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA

4.2.1 Hodnotenie antimykobakteriálnej aktivity

4.2.1.1 Metodika hodnotenia antimykobakteriálnej aktivity

U pripravených zlúčenín bola stanovená ich *in vitro* antimykobakteriálna aktivita. Testovanými kmeňmi boli *Mtb.* 331/88 (H₃₇Rv) v riedení 10⁻³ a dva kmene netuberkulózných (atypických) mykobaktérií: *Mycobacterium avium* 330/88 (rezistentná na INH, RIF, EMB a OFX) v riedení 10⁻⁵ a *Mycobacterium kansasii* 6509/96 v riedení 10⁻⁵. Kmeň 6509/96 je klinickým izolátom od pacienta z okresu Karviná, ostatné boli získané z Českej národnej zbierky typových kultúr.

Z hľadiska hodnotenia aktivity voči MDR a XDR kmeňom boli vybrané kmene *Mtb.* Praha 1 (rezistencia k INH, EMB, rifamycínom, STR a CFZ), *Mtb.* Praha 4 (rezistencia k INH, EMB, rifamycínom, STR, CFZ a OFX), *Mtb.* Praha 131 (rezistencia k INH, EMB, rifamycínom, STR, OFX, AMK a GEN, XDR-TBC kmeň), *Mtb.* 234/2005 a 242/2015 (rezistentné k INH, EMB, rifamycínom a STR) a *Mtb.* 9449/2005 (rezistencia na INH, rifamycíny a STR).

Stanovenie MIC bolo vykonávané mikrometódou v Šulovej pôde (SEVAC, Praha, Česká republika) v plastových P-doštičkách. Testované látky boli pridané v roztoku dimetylsulfoxidu tak, aby výsledné koncentrácie činili – rôzne podľa zadania, nejedná sa o súvislú radu riedení – 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,064 a 0,032 µM. MIC hodnoty boli odčítané pre kmene *M. tuberculosis* a *M. avium* 330/88 po 14 a 21 dňoch inkubácie pri 37 °C, u *Mycobacterium kansasii* 6509/96 navyše i po 7 dňoch.

MIC hodnota udáva najnižšiu koncentráciu, pri ktorej bola pozorovaná úplná inhibícia rastu mykobaktérií. Ako referenčná látka bolo použité liečivo 1. línie izoniazid, ktorý bol nariadený sterilnou destilovanou vodou [59].

Testovanie antimykobakteriálnej aktivity bolo vykonané v Zdravotnom ústave so sídlom v Ostrave, laboratórium pre diagnostiku mykobaktérií a tuberkulózy, pod vedením RNDr. Jiriny Stolaříkovej.

4.2.1.2 Výsledky hodnotenia antimykobakteriálnej aktivity

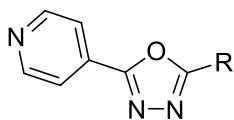
Výsledky stanovenia MIC základnej série zlúčenín (**15a-15q**; **16a-16q**) voči základnému panelu mykobaktérií sú zhrnuté prehľadne v tabuľkách **Tab. 3** a **Tab. 4**. Tučne vyznačené hodnoty predstavujú najlepšie aktivity pre daný kmeň mykobaktérie.

Tabuľka **Tab. 5** popisuje výsledky rozšíreného screeningu vybraných zlúčenín **15f-15h** a **16j-16l** voči rezistentným (MDR- a XDR-TBC) kmeňom.

Tabuľka 3 - Antimykobakteriálna aktivita *N*⁶-acylizonikotinohydrazidov **15a-15q**

Kód	R	MIC [μM]							ClogP
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
15a	Metyl	4	8	>10 ³	>10 ³	125	125	250	-0,93
15b	Etyl	32	64	>10 ³	>10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	-0,28
15c	Propyl	8	16	>10 ³	>10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	0,14
15d	Butyl	125	125	>10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	>10 ³	0,56
15e	Pentyl	32	64	10 ³	10 ³	10 ³	>10 ³	>10 ³	0,97
15f	Hexyl	1	2	500	10 ³	16	32	32	1,39
15g	Heptyl	1	1	250	250	4	8	8	1,81
15h	Oktyl	1	2	250	250	4	8	8	2,22
15i	Nonyl	2	8	64	64	4	8	8	2,64
15j	Decyl	8	16	64	64	8	16	32	3,06
15k	Undecyl	8	16	64	125	8	16	32	3,48
15l	Dodecyl	8	16	64	64	8	16	32	3,89
15m	Tridecyl	16	16	64	64	8	16	32	4,31
15n	Tetradecyl	8	16	32	32	8	16	32	4,73
15o	Pentadecyl	8	16	64	64	8	16	32	5,15
15p	Hexadecyl	8	16	32	32	8	16	32	5,56
15q	Heptadecyl	8	16	32	32	8	16	32	5,98
	INH	0,5	0,5	>250	>250	4	8	8	-0,67

Tabuľka 4 - Antimykobakteriálna aktivita 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov **16a-16q**



Kód	R	MIC [μ M]							ClogP
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
16a	Metyl	>32	>32	>10 ³	>10 ³	>32	>32	>32	0,55
16b	Etyl	>32	>32	>10 ³	>10 ³	>32	>32	>32	1,12
16c	Propyl	>32	>32	>10 ³	>10 ³	>32	>32	>32	1,54
16d	Butyl	>32	>32	>10 ³	>10 ³	>32	>32	>32	1,96
16e	Pentyl	>32	>32	10 ³	>10 ³	>32	>32	>32	2,37
16f	Hexyl	>32	>32	500	500	>32	>32	>32	2,79
16g	Heptyl	>32	>32	125	250	>32	>32	>32	3,21
16h	Oktyl	>32	>32	64	64	>32	>32	>32	3,63
16i	Nonyl	8	16	64	64	>32	>32	>32	4,04
16j	Decyl	4	8	64	125	16	>32	>32	4,46
16k	Undecyl	4	8	64	125	16	>32	>32	4,88
16l	Dodecyl	4	8	250	250	16	>32	>32	5,30
16m	Tridecyl	4	8	250	250	16	>32	>32	5,71
16n	Tetradecyl	8	16	250*	250*	250*	250*	250*	6,13
16o*	Pentadecyl	16	>32	250	250	32	>32	>32	6,55
16p	Hexadecyl	8	16	250*	250*	250*	250*	250*	6,96
16q*	Heptadecyl	16	32	250*	250*	250*	250*	250*	7,38
	INH	0,5	0,5	>250	>250	4	8	8	-0,67

* Zlúčeniny **16o** a **16q** sú totožné so zlúčeninami **11d** a **11e** (viď kapitola 2.2.2)

* Pri uvedenej koncentrácii bol pozorovaný rast kmeňa, pri dvojnásobnej koncentrácii bola prítomná zrazenina a/alebo zákal; stanovenie presnej hodnoty MIC nebolo možné.

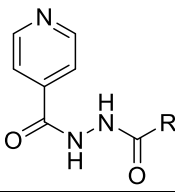
Tabuľka 5 - Aktivita vybraných zlúčenín (**15f-15h** a **16j-16k**) voči MDR- a XDR kmeňom *Mtb.*

	MIC [μ M]													
	<i>Mtb.</i> Praha 1		<i>Mtb.</i> Praha 4		<i>Mtb.</i> Praha 131		<i>Mtb.</i> 234/2005		<i>Mtb.</i> 9449/2007		<i>Mtb.</i> 7357/1998		<i>Mtb.</i> 8666/2010	
	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
15f	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
15g	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
15h	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
16j	16	16	8	16	8	16	16	16	8	16	16	16	16	16
16k	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8
16l	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8	4	8

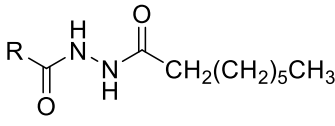
Mtb. Praha 1; rezistentná voči STM, INH, EMB, CFZ a rifamycínom. *Mtb.* Praha 4; rezistentná voči STM, INH, EMB, OFX, CFZ a rifamycínom. *Mtb.* Praha 131; rezistentná voči STM, INH, EMB, OFX, GEN, AMK a rifamycínom (XDR-TBC kmeň). *Mtb.* 9449/2007; rezistentná voči STM, INH a rifamycínom. *Mtb.* 234/2005; rezistentná voči STM, INH, EMB a rifamycínom. *Mtb.* 7357/1998; rezistentná voči STM, INH, EMB, OFX a rifamycínom. *Mtb.* 8666/2010; rezistentná voči STM, INH, EMB, OFX, CFZ a rifamycínom.

V **Tab. 6** a **Tab. 7** nájdeme hodnoty MIC modifikovaných 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov (**18a-18g**) a ich prekurzorov (**17a-17g**). Tučne zvýraznené hodnoty predstavujú najlepšie aktivity pre daný kmeň mykobaktérie.

Tabuľka 6 - Antimykobakteriálna aktivita modifikovaných *N*^c-acylheteroarylhydrazidov **17a-17g**



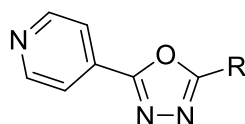
Kód	R	MIC [μ M]							ClogP
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
17a	2-Etylpentyl	>125	>125	>10 ³	>10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	2,51
17b	2-Metyhexyl	1	2	10 ³	>10 ³	16	32	64	2,51
17c	2-Propylbutyl	16	16	>10 ³	>10 ³	125	250	500	2,51
17d	Hept-1-én-1-yl	0,5	0,5	>10 ³	>10 ³	1	1	1	2,65
17e	Hept-7-én-1-yl	2	4	500	10 ³	16	32	64	2,25



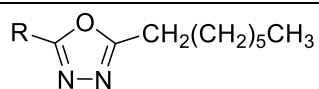
R = Heteroaryl

17f	Pyridín-3-yl	16	32	125	250	8	16	32	2,73
17g	Pyridín-2-yl	8	16	125	250	4	8	16	3,08
INH		0,5	0,5	>250	>250	4	8	8	-0,67

Tabuľka 7 – Aktivita modifikovaných disubstituovaných oxadiazolov **18a-18g**



Kód	R	MIC [μM]							ClogP
		<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 6509/96			
		14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	
18a	2-Etylpentyl	>125	>125	250	250	64	125	250	2,71
18b	2-Metylhexyl	>125	>125	250	250	125	250	250	2,71
18c	2-Propylbutyl	32	64	125	125	64	125	125	2,71
18d	Hept-1-én-1-yl	64	125	250	250	64	125	250	2,76
18e	Hept-1-én-7-yl	16	32	250	250	16	32	64	2,35



R = heteroaryl

18f	Pyridín-3-yl	>125	>125	250	250	125	250	250	2,84
18g	Pyridín-2-yl	2	4	250	250	4	8	8	3,05
	INH	0,5	0,5	>250	>250	4	8	8	-0,67

4.2.2 Hodnotenie cytotoxicity

4.2.2.1 Metodika hodnotenia cytotoxicity

Bunková línia ľudského hepatocelulárneho karcinómu HepG2 zakúpená od Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, Veľká Británia) bola kultivovaná v DMEM médiu (Dulbecco Essentials Eagle Medium; Sigma Aldrich, St. Louis, USA) doplnenom 10% fetálnym bovinným sérom (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakúsko), 1% roztokom L-glutamínu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a roztokom neesenciálnych aminokyselín (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) v humidnej atmosfére s obsahom 5 % CO₂ pri 37 °C.

Po ošetrovaní buniek trypsínom/EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) pri 37 °C boli bunky pozbierané k subkultivácii. Bunky ošetrované testovanými látkami boli na vyhodnotenie cytotoxicity použité ako experimentálne skupiny, zatiaľ čo neošetrované bunky HepG2 slúžili ako kontrolné skupiny.

Bunky boli nasadené na 96-jamkovú doštičku v hustote 15 000 buniek/jamku. Nasledujúci deň boli bunky v troch opakovaniach ošetrované testovanými látkami v širokom rozsahu koncentrácií. Paralelne boli inkubované nasledujúce kontroly: kontroly predstavujúce 100% životaschopnosť buniek, 0% životaschopnosť buniek (bunky inkubované s 10% DMSO), kontrola bez prítomnosti buniek a kontrola vehikula. Po 24 hodinách inkubácie v humidnej atmosfére obsahujúcej 5 % CO₂ pri 37 °C sa pridalo činidlo zo súpravy CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96; PROMEGA, Fitchburg, USA). Po 2 hodinách inkubácie pri 37 °C sa zaznamenala absorbancia vzoriek pri 490 nm (TECAN, Infinita M200, Rakúsko).

Použitý test CellTiter 96 je založený na redukcii žltého tetrazóliového farbiva MTS v živých bunkách na rozpustný fialový formazan, ktorý sa potom stanoví kolorimetricky pri vlnovej dĺžke 490 nm. K tejto redukcii dochádza v živých bunkách pôsobením cytochrómového systému a vzniknutá farebná zmena je v priamej úmere so životaschopnosťou buniek [60].

Výsledky experimentov sú vyjadrené ako inhibičná koncentrácia, ktorá znižuje životaschopnosť bunkovej populácie na 50 % z maximálnej životaschopnosti (IC₅₀). Štandardný toxikologický parameter IC₅₀ sa vypočítal nelineárnou regresiou zo semilogaritmickeho grafu inkubačnej koncentrácie voči percentu absorbancie vzhľadom na neošetrované kontroly s použitím softvéru GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.2.2.2 Výsledky hodnotenia cytotoxicity

Hodnotenie bolo vykonané u vybraných zlúčenín **15a-15q** a **16a-16q** (viď **Tab. 8**).

Tabuľka 8 – Hodnoty IC₅₀ a indexu selektivity (SI) zlúčenín **15a-15q** a **16a-16q**

Kód zlúčeniny	IC ₅₀ (μM)	Testované rozmedzie koncentrácií (μM)	SI (IC ₅₀ /MIC <i>Mtb. H37Rv</i>)
15a	>500	1 – 500	>125
15b	>500	1 – 500	>15,6
15c	>500	1 – 500	>62,5
15d	>500	1 – 500	>4
15e	>500	1 – 500	>15,6
15f	>500	1 – 500	>500
15g	>500	1 – 500	>500
15h	>500	1 – 500	>500
15i	>500	1 – 500	>250
15j	>500	1 – 500	>62,5
15k	>500	1 – 500	>62,5
15l	>500	1 – 500	>62,5
15m	281,4	1 – 500	17,6
15n	>500	1 – 500	>62,5
15o	38,03	1 – 250	4,8
15p	97,09	1 – 100	12,1
15q	>100	1 – 100	>12,5
16a	>500	1 – 500	>15,6
16b	>500	1 – 500	>15,6
16c	>500	1 – 500	>15,6
16d	>500	1 – 500	>15,6
16e	>500	1 – 500	>15,6
16f	>500	1 – 500	>15,6
16g	262,2	1 – 500	8,2
16h	>250	1 – 250	>7,8
16i	>250	1 – 250	>31,3
16j	>100	1 – 100	>25
16k	>100	1 – 100	>25
16l	>100	1 – 100	>25
16m	>50	1 – 50	>12,5
16n	>50	1 – 50	>6,3
16o	>50	1 – 50	>3,1
16p	>50	1 – 50	>6,3
16q	> 50	1 – 50	>3,1

5 DISKUSIA

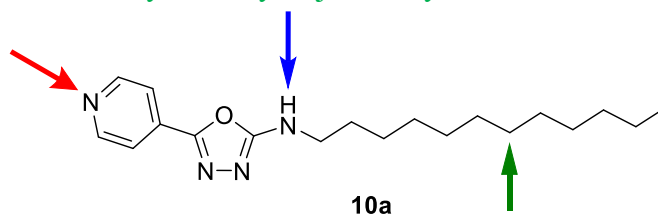
5.1 CHÉMIA

V tejto práci bolo pripravených spolu 48 zlúčenín, z ktorých je väčšine úplne originálnych. Niektoré zlúčeniny už boli v minulosti popísané, napr. zlúčeniny **16o** a **16q** v práci [42], ktoré boli resyntetizované k doplneniu celkového obrazu a pre dotestovanie na iných kmeňoch než v pôvodnej práci. Pôvodným cieľom práce bola príprava série zlúčenín derivátov 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov (**16a-16q**) a ich syntetických prekursorov *N*'-acylizonikotinohydrazidov (zlúčeniny **15a-15q**).

Ako to bolo uvedené v cieľoch tejto práce, na základe výsledkov aktivity voči mykobaktériám pôvodnej série zlúčenín (**15a-15q**; **16a-16q**) mala byť navrhnutá štruktúrna obmena látok, ktoré by pomohli k pochopeniu určitých vzťahov medzi štruktúrou a účinkom. Teoretické východisko pre obmeny predstavovala zlúčenina **15g**. Zvolené obmeny sa týkali izonikotinohydrazidového fragmentu alebo alkylového reťazca. V prvom prípade, teda obmeny izonikotinohydrazidu, boli ako východiskové látky použité jemu izomérsne nikotinohydrazid alebo pikolinohydrazid – v tomto prípade bola ponechaná pôvodná dĺžka alkylového reťazca (C₇) zlúčeniny **15g**. Druhý typ štruktúrnej obmeny, ktorá sa týkala obmeny alkylového reťazca, bola založená na použití rôzne vetvených osemuhlíkatých karboxylových kyselín alebo niektorých polohových izomérov okténovej kyseliny – v tomto prípade bol ponechaný pôvodný izonikotinohydrazidový fragment. Najprv bola teda pripravená ďalšia séria modifikovaných *N*'-acylheteroarylhydrazidov (**17a-17g**), ktoré boli následne taktiež podrobené dehydratívnej cyklizácii k príprave príslušných 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov (**18a-18g**).

Celá práca vznikla na základe výsledkov z predošlého výskumu našej pracovnej skupiny [28], odkiaľ pochádza zlúčenina *N*-dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**10a**). V zhrnutí sme teda túto zlúčeninu podrobili nasledujúcim štruktúrnym obmenám (Obr. 14):

- **Obmeny pyridín-4-ylu**
- **Izostérna zámena sekundárnej aminoskupiny**
- **Zmena charakteru alkylu v zmysle jeho nasýtenosti a rozvetvenia**



Obrázok 14 - Vykonané štruktúrne obmeny na zlúčenine **10a**

5.1.1 Syntéza *N*'-acylizonikotinohydrazidov

K syntéze *N*'-acylizonikotinohydrazidov pripadala v úvahu ich príprava reakciou INH **1** s príslušným acylchloridom alebo sa taktiež mohli získať reakciou izonikotinoylchloridu s príslušným acylhydrazidom. Nakoniec bola zvolená prvá možnosť z dôvodu komerčnej dostupnosti INH ako lacnej suroviny a taktiež väčšiny acylchloridov. Pripraviť na pracovisku bola potreba iba acylchloridy s vyšším nepárnym počtom uhlíkov (undekanoylchlorid, tridekanoylchlorid, pentadekanoylchlorid, heptadekanoylchlorid), ktoré neboli komerčne dostupné alebo bola ich cena príliš vysoká.

Tieto acylchloridy boli pripravené reakciou príslušnej karboxylovej kyseliny s tionylchloridom v inertnej atmosfére s vylúčením vlhkosti za použitia DMF ako katalyzátoru. Táto metóda k príprave acylchloridov bola zvolená, pretože väčšinou poskytuje dobré výťažky (v našom prípade kvantitatívne) a ďalšou výhodou tejto metódy je ľahká izolácia žiadaného acylchloridu, ktorá spočíva v prostom odparení zvyškového tionylchloridu, ktorý zároveň slúžil ako rozpúšťadlo.

Základná metodika prípravy *N*'-acylizonikotinohydrazidov spočívala v reakcii INH s príslušným acylchloridom v aprotickom rozpúšťadle za prítomnosti uhličitanu draselného, ktorý vychytáva vzniklú HCl. Zlúčeniny **15a-15f** nebolo možné purifikovať extrakciou z dôvodu ich hydrofilnosti (*ClogP* od -0,93 do 1,39), preto bol pomocou acetónu oddelený organický a anorganický podiel a surový produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou (Metóda č. 1; kapitola 4.1.2.2). Nami navrhnutá metóda poskytovala veľmi uspokojivé výťažky (68–83 %). Naproti tomu zlúčeniny **15g-15q** s dlhším alkylom, teda dostatočne lipofilné, už boli purifikované extrakciou etylacetátom (Metóda č. 2; kapitola 4.1.2.3). V tomto prípade bola ako aditívna metóda purifikácie zvolená rekryštalizácia z acetonitrilu.

Výťažky sa pohybovali v rozmedzí 70–99 %. Nižších výťažkov bolo dosiahnuto práve u hydrofilných zlúčenín (**15a-15f**), ktorých purifikácia bola náročnejšia a vyžadovala použitie kolónovej chromatografie, čo pravdepodobne spôsobilo väčšie straty produktu. Toto sme už nesledovali pri lipofilnejších derivátoch, u ktorých stĺpcová chromatografia nebola potrebná a tak sa nám v niektorých prípadoch podarilo dosiahnúť aj 99% výťažok (konkrétne sa jedná o zlúčeninu **15m**).

5.1.2 Syntéza modifikovaných *N'*-acylheteroarylhrazidov

Z bližšie neurčovaných dôvodov, metodika popísaná v bode 5.1.1 neposkytovala pri príprave zlúčenín **17a-17g** uspokojivé výťažky (pod 30 %). Bola vypracovaná náhradná metodika, založená na princípe tvorby asymetricky substituovaného hydrazidu pomocou karbodiimidového C-N couplingu (EDC.HCl, katalýza HOBT), kedy sa nám tým podarilo dosiahnuť uspokojivé výťažky (53–65 %). Medzi ďalšie výhody novo zvolenej metódy patrí taktiež fakt, že sa pracuje s činidlami, ktoré nie sú citlivé na vlhkosť, ako tomu bolo pri metóde popísanej v bode 5.1.1. Nevýhodou procesu je jeho relatívne vyššia nákladnosť vzhľadom k cene použitého EDC.HCl.

Surová reakčná zmes sa ľahko purifikovala rozdelením medzi etylacetát a vodu, keďže vznikajúca disubstituovaná močovina, nezreagovaný EDC.HCl ako aj HOBT ľahko a kvantitatívne prechádzali do vodnej vrstvy. Surový produkt bolo nutné ešte dodatočne purifikovať stĺpcovou chromatografiou.

5.1.3 Syntéza 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov

Metodika zvolená pre prípravu derivátov 1,3,4-oxadiazolu bola vybraná na základe výbornej empirickej skúsenosti na pracovisku [28, 58]. Medzi výhody tohto postupu patrí jeho robustnosť, keďže je použiteľný na širokú paletu rôzne substituovaných substrátov. Vzhľadom k veľkému molárnemu nadbytku *p*-toluénsulfonylchloridu nebola purifikácia extrakciou dostačujúca, keďže zbytky reagensí ostávali v organickom podiele. Použitie stĺpcovej chromatografie k prečisteniu produktov bolo preto nevyhnutné. Zvolený postup poskytoval pomerne dobré výťažky, ktoré sa pohybovali v rozmedzí 71–93 %.

5.2 BIOLÓGIA

5.2.1 Antimykobakteriálna aktivita

Všetky deriváty **15-18** boli podrobené *in vitro* screeningu voči trom mykobakteriálnym kmeňom. Panel zahrnoval jeden k liečivám citlivý kmeň *Mtb.* (331/88, t.j. H₃₇Rv) a dva netuberkulózne (atypické) kmene mykobaktérií – rezistentný *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 6509/96 (klinický izolát).

5.2.1.1 Základná séria zlúčenín (**15a-15q**; **16a-16q**)

Najcitlivejší kmeň predstavoval *Mtb.* H₃₇Rv s hodnotami MIC ≥ 1 μM pre deriváty *N*'-acylizonikotinohydrazidu (**15a-15q**) a ≥ 4 μM pre deriváty 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov (**16a-16q**). Naopak *M. avium* 330/88 vykazoval najvyšší stupeň odolnosti (hodnoty MIC ≥ 32 μM a ≥ 64 μM pre deriváty **15** a **16**, v uvedenom poradí), kým hodnoty MIC pre *M. kansasii* 6509/96 ležali medzi uvedenými hodnotami (MIC ≥ 4 μM pre deriváty **15** a ≥ 16 μM pre deriváty **16**).

Analyzovaním štruktúrno-aktívnych vzťahov *N*'-acylizonikotinohydrazidov **15** sa pre optimálnu aktivitu voči *Mtb.* H₃₇Rv neosvedčil veľmi krátky, ale ani veľmi dlhý alkylový reťazec – ako najaktívnejšie zlúčeniny sa javili zlúčeniny **15f**, **15g** a **15h** s alkylovým reťazcom od C₆ po C₈ (MIC 1–2 μM). V porovnaní s derivátmi *N*-alkyl-2-izonikotinoylhydrazín-1-karboxamidov **9**, ktoré dali vznik tejto práci (viď kapitola 2.2.1), boli tieto výsledky odlišné. U série **9** sa osvedčili práve prvé tri najkratšie alkylové reťazce (C₁ až C₃ s MIC 0,5–2 μM). Fakt konštatovaný autormi práce [28], že hydrofilita molekúl (Clog P <1) na antimykobakteriálnu aktivitu vplýva pozitívne sa teda v našej práci nepotvrdil, ba naopak u série **15** je možné pozorovať dobrú aktivitu až od zlúčenín, ktorých hodnota Clog P presiahne hodnotu 1. Toto však platí iba pre už spomínané zlúčeniny **15f-15h**. Ďalšie predlžovanie alkylového reťazca (**15j-15q**), a tým aj zvyšovanie lipofility, už nevykazovalo ďalšie zlepšenie aktivity, dokonca došlo k miernemu zhoršeniu (MIC 8–16 μM), čo môže byť ale spôsobené taktiež horšou rozpustnosťou daných zlúčenín.

Napriek tomu, že *M. avium* 330/88 vykazovala najnižšiu citlivosť voči zlúčeninám série **15**, v niektorých prípadoch – **15n**, **15p** a **15q** (alkylové reťazce C₁₄, C₁₆ a C₁₇, v uvedenom poradí; MIC 32 μM) – bolo zaznamenané aj viac než 7-násobné zlepšenie aktivity v porovnaní so štandardom, INH (MIC >250 μM). Pre dobrú aktivitu voči *M. avium* 330/88 sa teda osvedčili zlúčeniny s dlhým alkylovým reťazcom (t.j. lipofilné).

Najlepšiu aktivitu, porovnateľnú s INH voči *M. kansasii* 6509/96, vykazovali zlúčeniny so stredne dlhým alkylovým reťazcom **15g-15i** (C₇-C₉; MIC 4–8 μM). Túto hodnotu MIC sa podarilo dosiahnuť u jednej zlúčeniny pochádzajúcej zo série **9**. Jednalo sa o zlúčeninu s C₃ alkylovým reťazcom. Môžeme tak pozorovať podobný trend, aký bol pozorovaný v prípade aktivity voči *Mtb.* H₃₇Rv, t.j. že v prípade izostérnej zámény -NH-skupiny v karboxamidovej skupine zlúčenín zo série **9** za metylénovú skupinu budú aktívnejšie zlúčeniny s dlhším alkylovým reťazcom.

Cyklizácia príslušných *N*'-acylizonikotinohydrazidov **15** na im odpovedajúce 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazoly **16** nepriniesla so sebou významné zlepšenie antimykobakteriálnej aktivity. Tak napríklad aktivita prekursorových zlúčenín **15f-15g** voči *Mtb.* H₃₇Rv, ktorá bola porovnateľná s INH, sa po premene na príslušný oxadiazol **16f-16g** zhoršila (MIC >32 μM). U derivátov **16** dosahovali najlepšie hodnoty MIC zlúčeniny **16j-16m**. Jedná sa o zlúčeniny s dlhším alkylovým reťazcom, ako to bolo u najaktívnejších derivátov **15** (alkyly C₁₀-C₁₃), a ich MIC sa pohybovali v rozmedzí 4–8 μM. Pozorujeme teda mierne zhoršenie aktivity v porovnaní s prekursorami **15**, kde sa podarilo dosiahnuť aj o polovicu nižšie hodnoty MIC. V kontraste k sérii *N*-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov **10** (viď kapitola 2.2.1) priniesla zámena -NH-skupiny, ktorá spája alkylový reťazec s 1,3,4-oxadiazolovým kruhom, za izostérnu metylénovú skupinu nepatrné zlepšenie aktivity a rozšírenie počtu aktívnych zlúčenín – u derivátov **10** sa ako jediná aktívna zlúčenina javila už práve spomínaný *N*-dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín (**10a**; MIC 4–8 μM).

Rovnaký trend bol pozorovaný aj pri aktivite voči *M. avium* 330/88 a *M. kansasii* 6509/96, kde sa cyklizáciou na príslušné 1,3,4-oxadiazoly **16** nepodarilo prekonať aktivity, ktoré vykazovali im príslušné prekursorov **15**. Najlepšími hodnotami MIC voči *M. avium* 330/88 disponujú zlúčeniny **16h-16k** (64–125 μM) a v prípade *M. kansasii* 6509/96 sa jedná o zlúčeniny **16j-16m** (MIC 16–32 μM).

Z oboch sérií boli vybrané tri zlúčeniny vykazujúce najlepšiu aktivitu voči *Mtb.* (**15f-15g** a **16j-16l**), ktoré boli ďalej podrobené rozšírenému screeningu voči siedmim MDR- a XDR kmeňom *Mtb.* (viď **Tab. 5**, kapitola 2.2.1). Všetky vybrané zlúčeniny vykazovali pomerne uniformné výsledky s hodnotami MIC 4–8 μM pre jednotlivé rezistentné kmene *Mtb.* Jedinou zlúčeninou ktorá sa nepatrne odlišovala od ostatných zlúčenín (avšak hodnoty sú úplne porovnateľné s ostatnými hodnotami), bola **16j**, ktorej MIC sa pohybovali v rozmedzí 8-16 μM. Za veľkú výhodu považujeme, že nebola

pozorovaná žiadna skrížená rezistencia s antituberkulotikami prvej a druhej línie. Rovnako boli vybrané aj zlúčeniny z predlohovej série [28] **9** a **10**, ktoré taktiež boli podrobené testovaniu voči rezistentným kmeňom *Mtb.* Avšak jedine *N*-dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín (**10a**) dosahoval hodnôt MIC 4–8 µM.

5.2.1.2 Série modifikovaných zlúčenín (**17a-17g**; **18a-18g**)

Podobne aj v prípade zlúčenín pochádzajúcich zo série **17** a **18** vykazovala najvyššiu citlivosť *Mtb.* H₃₇Rv s hodnotami MIC ≥0,5 µM pre *N*'-acylheteroarylhydrazidy **17a-17g** a ≥2 µM pre 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazoly **18a-18g**. Ďalším v poradí z hľadiska citlivosti bol kmeň *M. kansasii* 6509/96 s hodnotami MIC ≥1 µM pre deriváty **17** a ≥4 µM pre deriváty **18**. Rovnako sme mohli pozorovať najvyššiu odolnosť *M. avium* 330/88 voči pripraveným zlúčeninám – najnižšia zaznamenaná hodnota MIC pre deriváty oboch sérií **17** a **18** bola 125 µM.

V prípade prekurzorových zlúčenín **17** priniesla najlepšie výsledky voči *Mtb.* H₃₇Rv modifikácia alkylového reťazca v zmysle zavedenia dvojnej väzby naň – tu ale záviselo na polohe dvojnej väzby. Kým zlúčenina **17d** s dvojnou väzbou bližšie k acylovému karbonylu dosiahla zo všetkých pripravených zlúčenín vôbec (MIC = 0,5 µM; táto hodnota je zhodná s MIC štandardu INH), jej terminálne umiestnenie (**17e**) nebolo pre aktivitu až tak výhodné, hoci aj tieto hodnoty MIC sú ešte pomerne nízke (MIC 2-4 µM). Zavedenie dvojnej väzby do alkylového reťazca ďalej vplývalo veľmi pozitívne aj na aktivitu voči *M. kansasii* 6509/96, kde znova dosiahla zlúčenina **17d** lepšie výsledky (MIC = 1 µM) v porovnaní so zlúčeninou **17e** (MIC 16–64 µM). Tieto hodnoty u zlúčeniny **17d** sú dokonca 4–8× nižšie než u štandardu INH (MIC 4–8 µM). Jedine u *M. avium* 330/88 neprinieslo zavedenie dvojnej väzby na alkylový reťazec žiadne významné vylepšenie aktivity.

Ak sa pozrieme na to, ako charakter alkyly v zmysle jeho vetvenia ovplyvnil aktivitu prekurzorových zlúčenín **17** voči testovaným kmeňom mykobaktérií, môžeme pozorovať, že významnejších výsledkov bolo dosiahnuté iba schopnosti inhibovať rast *Mtb.* H₃₇Rv. Boli pripravené tri deriváty s rôzne vetveným alkylovým reťazcom, konkrétne 2-etylpentyl (**17a**), 2-metylhexyl (**17b**) a 2-propylbutyl (**17c**). Na základe výsledkov je možné konštatovať, že najlepšiu aktivitu porovnateľnú s INH dosiahla zlúčenina **17b** (MIC 1–2 µM). U ďalších dvoch zlúčenín **17a** a **17c** boli hodnoty MIC horšie (>125 a 16 µM; v uvedenom poradí). Ďalšie dva kmene mykobaktérií nevykazovali významnú citlivosť voči

zlúčeninám s vetveným reťazcom. Jedine u **17b** sa zaznamenala mierna aktivita voči *M. kansasii* 6509/96 (MIC 16–64 μM).

Rovnako ani výmena izonikotinohydrazidu za izoméreny nikotinohydrazid (**17f**) alebo pikolinohydrazid (**17g**) nepriniesla žiadne významné zlepšenie v aktivite. MIC spomínaných zlúčenín voči *Mtb.* H₃₇Rv sa pohybovali v rozmedzí od 8–32 μM . V prípade *M. avium* 330/88 je možné sledovať nepatrné zníženie hodnôt MIC (125–250 μM ; platí pre obe zlúčeniny **17f** a **17g**) v porovnaní so štandardom INH (MIC >250 μM). Porovnateľné hodnoty so štandardom INH dosiahla zlúčenina **17g** voči *M. kansasii* (MIC 4–16 μM).

U série modifikovaných disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov **18** môžeme pozorovať rovnaký trend, ako to bolo u základnej série zlúčenín – t.j. po cyklizácii prekursorových zlúčenín došlo vo väčšine prípadov k zníženiu aktivity voči *Mtb.* H₃₇Rv. Jedinou výnimkou je zlúčenina **18g** (náhrada izonikotinového fragmentu za pikolinový), ktorá ako jediná má lepšiu aktivitu (a zároveň porovnateľnú so štandardom INH) ako jej prekursor **17g** (MIC 2–4 μM pre **18g**; MIC 8–16 μM pre **17g**). Ďalšie dva typy štruktúrnych obmien nepriniesli významné výsledky – MIC pre zlúčeniny s rôzne vetveným reťazcom (**18a-18c**) sa pohybovali od 32 do >125 μM a pre zlúčeniny s dvojnou väzbou na alkylovom reťazci (**18d, 18e**) sa pohybovala v rozmedzí 16–125 μM .

Kmeň *M. avium* 330/88 nevykazoval vyššiu citlivosť voči pripraveným zlúčeninám série **18** než použitý štandard INH (MIC >250 μM) – jedine **18c** vykazovala o niečo lepšiu aktivitu (MIC 125 μM). Rovnako na tom bola aj citlivosť *M. kansasii* 6509/96, kedy iba v prípade zlúčeniny **18g** sa dosiahla totožná aktivita s INH (MIC pre obe zlúčeniny 4–8 μM).

5.2.2 Cytotoxicita

Boli hodnotené dve skupiny po sedemnástich zlúčeninách. V prvej skupine **15a** až **15q** bola cytotoxicita hodnotená v koncentračnom rozsahu 1-500 μM , ale nie pre všetky zlúčeniny (u **15o** do 250 μM ; u **15p** a **15q** do 100 μM) kvôli horšej rozpustnosti zlúčenín.

Zlúčeniny možno rozdeliť do ďalších podskupín podľa stanovených hodnôt IC₅₀. Dve látky, **15o** a **15p**, vykazovali miernu toxicitu s IC₅₀ pod alebo blízko 100 μM . Jedna zlúčenina **15m** vykazovala miernu toxicitu s IC₅₀ 281,4 μM . Zvyšných 14 látok, **15a-15l**, **15n** a **15q**, nevykazovalo významnú toxicitu *in vitro* v použitom koncentračnom rozsahu.

V druhej skupine **16a** až **16q** bola cytotoxicita hodnotená taktiež v koncentračnom rozsahu 0–500 μM , ale pre horšiu rozpustnosť nie pre všetky zlúčeniny – u **16h** a **16i** do 250 μM , **16j-16l** do 100 μM a u **16m-16q** do 50 μM .

Zlúčeniny je tiež možné rozdeliť do dvoch podskupín podľa stanovených hodnôt IC_{50} . Jedna látka, **16g**, vykazovala miernu toxicitu s IC_{50} 262,2 μM . Ďalších 16 látok, **16a** až **16f** a **16h** až **16q**, nevykazovalo významnú toxicitu *in vitro* v použítom koncentračnom rozsahu.

6 ZÁVER

V tejto práci boli syntetizované dve hlavné série 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov a ich prekursorov. Prvá séria disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov **16** a ich prekursorov **15** slúžila k overeniu nutnosti prítomnosti -NH- skupiny v sérii zlúčenín **10** (pripravená v minulosti našou výskumnou skupinou; [28]) ako linkeru spájajúceho alkylový reťazec s 1,3,4-oxadiazolovým kruhom. Druhá pripravená séria modifikovaných disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov **18** a ich prekursorov **17** mala pomôcť v porozumení určitých štruktúrno-aktívnych vzťahov v rámci palety pripravených zlúčenín. Na základe výsledkov našej práce je možné konštatovať tieto závery:

1. Prítomnosť spomínaného -NH- linkeru nie je pre aktivitu nevyhnutný – v rámci základnej série **15** a **16** sme mohli pozorovať, že aj zlúčeniny bez nej si zachovali aktivitu voči mykobaktériám.
2. Pre aktivitu voči *Mtb.* H₃₇Rv prekursorových zlúčenín boli výhodné stredne dlhé alkylové reťazce s C₆–C₈ (u zlúčenín, ktoré -NH- linker obsahovali, boli preferované tri najkratšie alkyly: C₁–C₃). U oxadiazolov došlo k rozšíreniu počtu aktívnych zlúčenín – kým u derivátov *N*-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov vykazovala dobrú aktivitu jediná zlúčenina (alkylový reťazec s C₁₂), u 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov mali zachovanú dobrú aktivitu až štyri zlúčeniny, ktorých dĺžka alkylového reťazca sa pohybovala od C₁₀ do C₁₃.
3. Rovnako aj v prípade aktivity voči *M. kansasii* 6509/96 sa podarilo dosiahnuť lepších výsledkov u zlúčenín bez -NH- linkeru – platí to najmä pre sériu prekursorových *N*'-acylizonikotinohydrazidov **15**, kedy uspokojivé aktivity mali zlúčeniny s C₇–C₉. Naopak jeho odstránenie ale malo negatívny vplyv na aktivitu zlúčenín voči atypickému kmeňu *M. avium* 330/88.
4. Vybrané zlúčeniny testované voči MDR- a XDR-*Mtb.* kmeňom preukázali zachovanú aktivitu bez skříženej rezistencie s klinicky používanými antituberkulotikami. V prípade zlúčenín s -NH- linkerom vykazovala aktivitu jediná testovaná zlúčenina, *N*-dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín **10a**. V nami pripravenej sérii vykazovali všetky testované zlúčeniny **15f-15h** (alkyly C₆–C₈) a **16j-16l** (alkyly C₁₀–C₁₂) uspokojivé výsledky. Došlo teda jednak k rozšíreniu počtu aktívnych derivátov 1,3,4-oxadiazolu a zároveň sa podarilo dosiahnuť aktivitu aj u prekursorových zlúčenín. Zaujímavé je, že ani

prekursorové *N*'-acylizonikotinohydrazidy nevykazujú vlastnosti proliečiva INH. Usudzujeme tak na základe toho, že aj vybrané zlúčeniny **15f-15g** vykazujú aktivitu voči MDR- a XDR-kmeňom *Mtb.* (hoci s trochu vyššími hodnotami MIC) – to môže byť práve spôsobené odlišným MÚ. Túto hypotézu je ale potreba ďalej skúmať a vykonať stanovenie MÚ.

5. Zavedenie dvojnej väzby na alkylový reťazec vplýva veľmi dobre na aktivitu iba u prekursorových zlúčenín. Po cyklizácii na príslušný oxadiazol už prítomnosť dvojnej väzby nemá pozitívny vplyv na aktivitu, skôr došlo k miernemu zhoršeniu aktivity. U prekursorových *N*'-acylheteroarylhydrazidoch **17** ale závisí na polohe dvojnej väzby. Z výsledkov tejto práce vyplýva, že je výhodnejšia poloha dvojnej väzby bližšie ku acylovému karbonylu (**17d**; vôbec najnižšia MIC voči *Mtb.* H₃₇Rv a zároveň vynikajúca aktivita voči *M. kansasii* 6509/96) než jej terminálne umiestnenie. Pre upresnenie by bolo vhodné ďalej pripraviť aj deriváty, kde budú použité aj ďalšie polohové izoméry okténovej kyseliny alebo taktiež jej polynenasýtené analógy.
6. Vetvenie alkylového reťazca neprináša žiadne zlepšenie aktivity u disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov oproti zlúčeninám s lineárnym alkylom. Rovnako tomu je aj v prípade prekursorových *N*'-acylheteroarylhydrazidoch.
7. Pre aktivitu 2-alkyl-5-heteroaryl-1,3,4-oxadiazolov sa nezdá byť izonikotinohydrazidový fragment ako najvýhodnejší – jeho náhrada za pikolinohydrazid (**18g**) so sebou priniesla najnižšie hodnoty MIC u *Mtb.* H₃₇Rv a voči *M. kansasii* 6509/96, v porovnaní so všetkými zlúčeninami celej série 1,3,4-oxadiazolov **16** obsahujúcich vo svojej štruktúre izonikotinohydrazidový fragment. Zaujímavé je, že v prípade prekursorových zlúčenín toto neplatí – taktiež to môže byť spôsobené odlišným MÚ, je ale potreba sa s ním ďalej zaoberať v budúcnosti a vykonať ďalšie testovania na jeho stanovenie.
8. Ani jedna z pripravených zlúčenín zo série **15** a **16** nevykazuje signifikantnú *in vitro* toxicitu na bunky línie HepG2 v použitom koncentračnom rozsahu.

7 POUŽITÉ ZDROJE

1. Homolka, J., *Tuberkulóza*. 2017, Nakladatelství Karolinum: Praha.
2. World Health Organization, *Global tuberculosis report 2021*. 2021, Geneva: World Health Organization.
3. Seung, K.J., S. Keshavjee, and M.L. Rich, *Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(9): p. a017863.
4. Ahmad, Z., N.H. Makaya, and J. Grosset. *History of Drug Discovery: Early Evaluation Studies and Lessons Learnt from Them*. Prog Respir Res, 2011. **40**, 2-9.
5. Chauhan, P.M., N. Sunduru, and M. Sharma, *Recent advances in the design and synthesis of heterocycles as anti-tubercular agents*. Future Med Chem, 2010. **2**(9): p. 1469-500.
6. Sharma, S., et al., *A review on various heterocyclic moieties and their antitubercular activity*. Biomed Pharmacother, 2011. **65**(4): p. 244-251.
7. Sloan, D.J., G.R. Davies, and S.H. Khoo, *Recent advances in tuberculosis: New drugs and treatment regimens*. Curr Respir Med Rev, 2013. **9**(3): p. 200-210.
8. Seaworth, B.J. and D.E. Griffith, *Therapy of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*. Microbiol Spectr, 2017. **5**(2): p. 5.2.19.
9. Součková, L. and A. Ruzsíková, *New antibiotics in the clinical practise and in the clinical trials*. Klin Farmakol Farm, 2016. **30**(3): p. 23-28.
10. Fair, R.J. and Y. Tor, *Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century*. Perspect Medicin Chem, 2014. **6**: p. 25-64.
11. Angula, K.T., L.J. Legoabe, and R.M. Beteck, *Chemical Classes Presenting Novel Antituberculosis Agents Currently in Different Phases of Drug Development: A 2010-2020 Review*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(5).
12. Pethe, K., et al., *Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1157-1160.
13. Li, Y., F. Sun, and W. Zhang, *Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging*. Drug Dev Res, 2019. **80**(1): p. 98-105.
14. Andries, K., et al., *A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2005. **307**(5707): p. 223-227.
15. Ryan, N.J. and J.H. Lo, *Delamanid: First Global Approval*. Drugs, 2014. **74**(9): p. 1041-1045.
16. Keam, S.J., *Pretomanid: First Approval*. Drugs, 2019. **79**(16): p. 1797-1803.
17. Stancil, S.L., F. Mirzayev, and S.M. Abdel-Rahman, *Profiling Pretomanid as a Therapeutic Option for TB Infection: Evidence to Date*. Drug Des Devel Ther, 2021. **15**: p. 2815-2830.
18. Ignatius, E.H. and K.E. Dooley, *New Drugs for the Treatment of Tuberculosis*. Clin Chest Med, 2019. **40**(4): p. 811-827.
19. *WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee*, in *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: Module 4: Treatment - Drug-resistant tuberculosis treatment*. World Health Organization: Geneva.
20. Glomb, T. and P. Świątek, *Antimicrobial Activity of 1,3,4-Oxadiazole Derivatives*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13).
21. De, S.S., M.P. Khambete, and M.S. Degani, *Oxadiazole scaffolds in anti-tuberculosis drug discovery*. Bioorg Med Chem Lett, 2019. **29**(16): p. 1999-2007.

22. Verma, S.K., et al., *Anti-tuberculosis activity and its structure-activity relationship (SAR) studies of oxadiazole derivatives: A key review*. Eur J Med Chem, 2021. **209**: p. 112886.
23. Boström, J., et al., *Oxadiazoles in Medicinal Chemistry*. J Med Chem, 2012. **55**(5): p. 1817-1830.
24. Kudelko, A., K. Jasiak, and K. Ejsmont, *Study on the synthesis of novel 5-substituted 2-[2-(pyridyl)ethenyl]-1,3,4-oxadiazoles and their acid-base interactions*. Monatsh Chem, 2015. **146**(2): p. 303-311.
25. de Oliveira, C.S., et al., *Synthetic approaches and pharmacological activity of 1,3,4-oxadiazoles: a review of the literature from 2000-2012*. Molecules, 2012. **17**(9): p. 10192-10231.
26. Dolman, S.J., et al., *Superior Reactivity of Thiosemicarbazides in the Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles*. J Org Chem, 2006. **71**(25): p. 9548-9551.
27. Krátký, M., et al., *N-Alkyl-2-[4-(trifluoromethyl)benzoyl]hydrazine-1-carboxamides and Their Analogues: Synthesis and Multitarget Biological Activity*. Molecules, 2020. **25**(10): p. 2268.
28. Vosátka, R., et al., *New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action*. Eur J Med Chem, 2018. **151**: p. 824-835.
29. Rajapakse, H.A., et al., *A mild and efficient one pot synthesis of 1,3,4-oxadiazoles from carboxylic acids and acyl hydrazides*. Tetrahedron Lett, 2006. **47**(28): p. 4827-4830.
30. Luczynski, M. and A. Kudelko, *Synthesis and Biological Activity of 1,3,4-Oxadiazoles Used in Medicine and Agriculture*. Appl Sci, 2022. **12**(8).
31. Siwach, A. and P.K. Verma, *Therapeutic potential of oxadiazole or furadiazole containing compounds*. BMC Chem, 2020. **14**(1): p. 70.
32. Nelson, J.B., et al., *Phase 3, randomized, placebo-controlled study of zibotentan (ZD4054) in patients with castration-resistant prostate cancer metastatic to bone*. Cancer, 2012. **118**(22): p. 5709-5718.
33. Miller, K., et al., *Phase III, randomized, placebo-controlled study of once-daily oral zibotentan (ZD4054) in patients with non-metastatic castration-resistant prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2013. **16**(2): p. 187-192.
34. Stern, E.P., et al., *Zibotentan in systemic sclerosis-associated chronic kidney disease: a phase II randomised placebo-controlled trial*. Arthritis Res Ther, 2022. **24**(1): p. 130.
35. Macaev, F., et al., *The structure-antituberculosis activity relationships study in a series of 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazole derivatives*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(22): p. 6792-6807.
36. Ahsan, M.J., et al., *Discovery of novel antitubercular 1,5-dimethyl-2-phenyl-4-([5-(arylamino)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]methylamino)-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-one analogues*. Bioorg Med Chem Lett, 2012. **22**(2): p. 969-972.
37. Mathew, B., et al., *Design, synthesis, toxicity estimation and molecular docking studies of N-(Furan-2-yl)-1-(5-substituted) phenyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl) methanimine as antitubercular agents*. Ind J Pharm Sci, 2014. **76**(5): p. 401-406.
38. Das, R. and D.K. Mehta, *Evaluation and Docking Study of Pyrazine Containing 1, 3, 4-Oxadiazoles Clubbed with Substituted Azetid-2-one: A New Class of Potential Antimicrobial and Antitubercular*. Drug Res (Stuttg), 2020. **71**(01): p. 26-35.
39. Karabanovich, G., et al., *Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2016. **59**(6): p. 2362-2380.

40. Karabanovich, G., et al., *S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents*. Eur J Med Chem, 2017. **126**: p. 369-383.
41. Roh, J., et al., *Development of water-soluble 3,5-dinitrophenyl tetrazole and oxadiazole antitubercular agents*. Bioorg Med Chem, 2017. **25**(20): p. 5468-5476.
42. Navarrete-Vázquez, G., et al., *Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(16): p. 5502-5508.
43. Khalil, N.A., A.M. Kamal, and S.H. Emam, *Design, Synthesis, and Antitumor Activity of Novel 5-Pyridyl-1,3,4-oxadiazole Derivatives against the Breast Cancer Cell Line MCF-7*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(5): p. 763-773.
44. Chandra, T., et al., *Synthesis of substituted acridinyl pyrazoline derivatives and their evaluation for anti-inflammatory activity*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(5): p. 1772-1776.
45. Ghani, U. and N. Ullah, *New potent inhibitors of tyrosinase: Novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3H)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(11): p. 4042-4048.
46. Naerum, L., L. Nørskov-Lauritsen, and P.H. Olesen, *Scaffold hopping and optimization towards libraries of glycogen synthase kinase-3 inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2002. **12**(11): p. 1525-1528.
47. Crane, S.N., et al., *β -Substituted Cyclohexanecarboxamide: A Nonpeptidic Framework for the Design of Potent Inhibitors of Cathepsin K*. J Med Chem, 2006. **49**(3): p. 1066-1079.
48. Bayrak, H., et al., *Synthesis of some new 1,2,4-triazoles starting from isonicotinic acid hydrazide and evaluation of their antimicrobial activities*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(11): p. 4362-4366.
49. Shen, Z.H., et al., *Crystal Structure of 2-(Pyridin-4-yl)-5-(Undecylthio)-1,3,4-Oxadiazole*. J Struct Chem, 2018. **59**: p. 1236-1240.
50. Ghose, A.K. and G.M. Crippen, *Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions*. J Chem Inf Comput Sci, 1987. **27**(1): p. 21-35.
51. Martins, F., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of novel isoniazid derivatives with potent antitubercular activity*. Eur J Med Chem, 2014. **81**: p. 119-138.
52. Kakimoto, S. and I. Tone, *Antituberculous Compounds. XXII.1 Monoalkylaminobenzothioamides*. J Med Chem, 1965. **8**(6): p. 867-868.
53. Judge, V., et al., *Synthesis, antimycobacterial, antiviral, antimicrobial activity and QSAR studies of N(2)-acyl isonicotinic acid hydrazide derivatives*. Med Chem, 2013. **9**(1): p. 53-76.
54. Yale, H.L., et al., *Chemotherapy of Experimental Tuberculosis. VIII. The Synthesis of Acid Hydrazides, their Derivatives and Related Compounds 1,2*. J Am Chem Soc, 1953. **75**(8): p. 1933-1942.
55. Rodrigues, M.O., et al., *Synthesis and antimycobacterial activity of isoniazid derivatives from renewable fatty acids*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(22): p. 6910-6914.
56. Geyl, K., et al., *Convenient entry to N-pyridinylureas with pharmaceutically privileged oxadiazole substituents via the acid-catalyzed CH activation of N-oxides*. Tetrahedron Lett, 2019. **60**(40): p. 151108.
57. Boulos, L.S. and I.T. Hennawy, *STUDIES ON PHOSPHONIUM YLIDES-XIV. THE BEHAVIOUR OF 5(4-PYRIDYL)-2-THIONO- 1,3, 4-OXADIAZOLE TOWARDS WITTIG REAGENTS*. Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem, 1991. **56**(1-4): p. 65-69.

58. Pflégr, V., et al., *5-Aryl-1,3,4-oxadiazol-2-amines Decorated with Long Alkyl and Their Analogues: Synthesis, Acetyl- and Butyrylcholinesterase Inhibition and Docking Study*. Pharmaceuticals, 2022. **15**(4).
59. Krátký, M., et al., *Antibacterial activity of salicylanilide 4-(trifluoromethyl)-benzoates*. Molecules, 2013. **18**(4): p. 3674-3688.
60. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*, in *Biotechnology Annual Review*. 2005, Elsevier. p. 127-152.

8 ZOZNAM SKRATIEK

AMK	Amikacín
ATP	Adenozíntrifosfát
CFZ	Klofazimín
DCM	Dichlórmetán
DMF	<i>N,N</i> -Dimetylformamid
DMSO	Dimetylsulfoxid
EDC.HCl	<i>N</i> -(3-Dimetylamino-propyl)- <i>N</i> '-etylkarbodiimid hydrochlorid
EMB	Etambutol
GEN	Gentamicín
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol hydrát
IC ₅₀	Inhibičná koncentrácia, ktorá znižuje životaschopnosť bunkovej populácie na 50 % z maximálnej životaschopnosti
INH	Isoniazid
MDR	Multidrug resistant (Multiliekovo rezistentný)
MeOH	Metanol
MF	Mobilná fáza
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazólium
MÚ	Mechanizmus účinku
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia

OFX	Ofloxacín
PZA	Pyrazínamid
R_f	Retenčný faktor
RIF	Rifampicín
RVO	Rotačná vákuová odparka
SI	Index selektivity
STR	Streptomycín
TBC	Tuberkulóza
THF	Tetrahydrofurán
TLC	Thin layer chromatography (Chromatografia na tenkej vrstve)
US FDA	The United States Food and Drug Administration (Správa potravín a liečiv v USA)
XDR	Extensively drug resistant (Extenzívne liekovo rezistentný)

9 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1 - Štruktúry INH 1 a PZA	13
Obrázok 2 - Štruktúry nových registrovaných antituberkulotík (bedachilín, delamanid, pretomanid)	15
Obrázok 3 - Regioizoméry oxadiazolu.....	16
Obrázok 4 - Možné syntetické cesty prípravy 2,5-disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov (prevzaté z Kudelko, 2022 [30]).....	17
Obrázok 5 - Štruktúry liečiv obsahujúcich 1,3,4-oxadiazolový fragment.....	18
Obrázok 6 - Štruktúry najaktívnejších oxadiazolových zlúčenín.....	19
Obrázok 7 - Štruktúry najaktívnejších nitrovaných zlúčenín pochádzajúce z našej výskumnej skupiny....	20
Obrázok 8 - Syntéza <i>N</i> -alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amínov	21
Obrázok 9 - <i>N</i> -dodecyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-amín.....	22
Obrázok 10 - Zlúčeniny Navarrete-Vázquez <i>et al.</i>	22
Obrázok 11 - 2-(Pyridín-4-yl)-5-(undecyltio)-1,3,4-oxadiazol	24
Obrázok 12 - Schéma prípravy zlúčenín 15a-15q a 16a-16q ; DMF – <i>N,N</i> -dimetylformamid; THF – tetrahydrofurán; RT – room temperature (laboratórna teplota); TsCl – <i>p</i> -toluénsulfonylchlorid.....	27
Obrázok 13 - Schéma prípravy zlúčenín 17a-17g a 18a-18g ; HOBt - 1-hydroxybenzotriazol hydrát; EDC. HCl - <i>N</i> -(3-dimetylamínopropyl)- <i>N'</i> -etylkarbodiimid hydrochlorid; on – over night (cez noc).....	27
Obrázok 14 - Vykonané štruktúrne obmeny na zlúčenine 10a	49

10 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 - MIC vybraných zlúčenín 11	23
Tabuľka 2 - Veľkosti inhibičných zón zlúčenín 12 a 13	24
Tabuľka 3 - Antimykobakteriálna aktivita <i>N'</i> -acylizonikotinohydrazidov 15a-15q	43
Tabuľka 4 - Antimykobakteriálna aktivita 2-alkyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolov 16a-16q	44
Tabuľka 5 - Aktivita vybraných zlúčenín (15f-15h a 16j-16k) voči MDR- a XDR kmeňom <i>Mtb</i>	45
Tabuľka 6 - Antimykobakteriálna aktivita modifikovaných <i>N'</i> -acylheteroarylhydrazidov 17a-17g	45
Tabuľka 7 – Aktivita modifikovaných disubstituovaných oxadiazolov 18a-18g	46
Tabuľka 8 – Hodnoty IC ₅₀ a indexu selektivity (SI) zlúčenín 15a-15q a 16a-16q	48

11 PRÍLOHY

Spektrum 1 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum N^c -propionylizonikotinohydrazidu **15b**

Spektrum 2 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum N^c -propionylizonikotinohydrazidu **15b**

Spektrum 3 - IR (ATR-Ge) spektrum N^c -propionylizonikotinohydrazidu **15b**

Spektrum 4 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum N^c -oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**

Spektrum 5 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum N^c -oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**

Spektrum 6 - IR (ATR-Ge) spektrum N^c -oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**

Spektrum 7 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum 2-etyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**

Spektrum 8 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum 2-etyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**

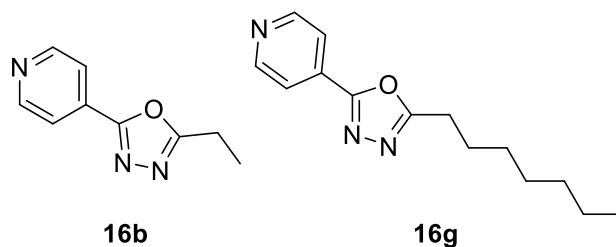
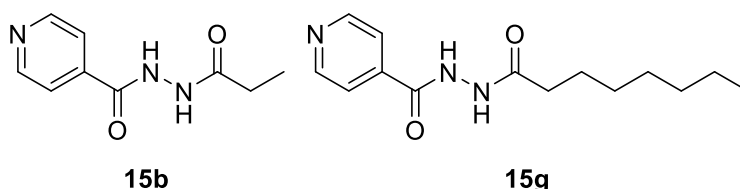
Spektrum 9 - IR (ATR-Ge) spektrum 2-etyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**

Spektrum 10 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum 2-heptyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**

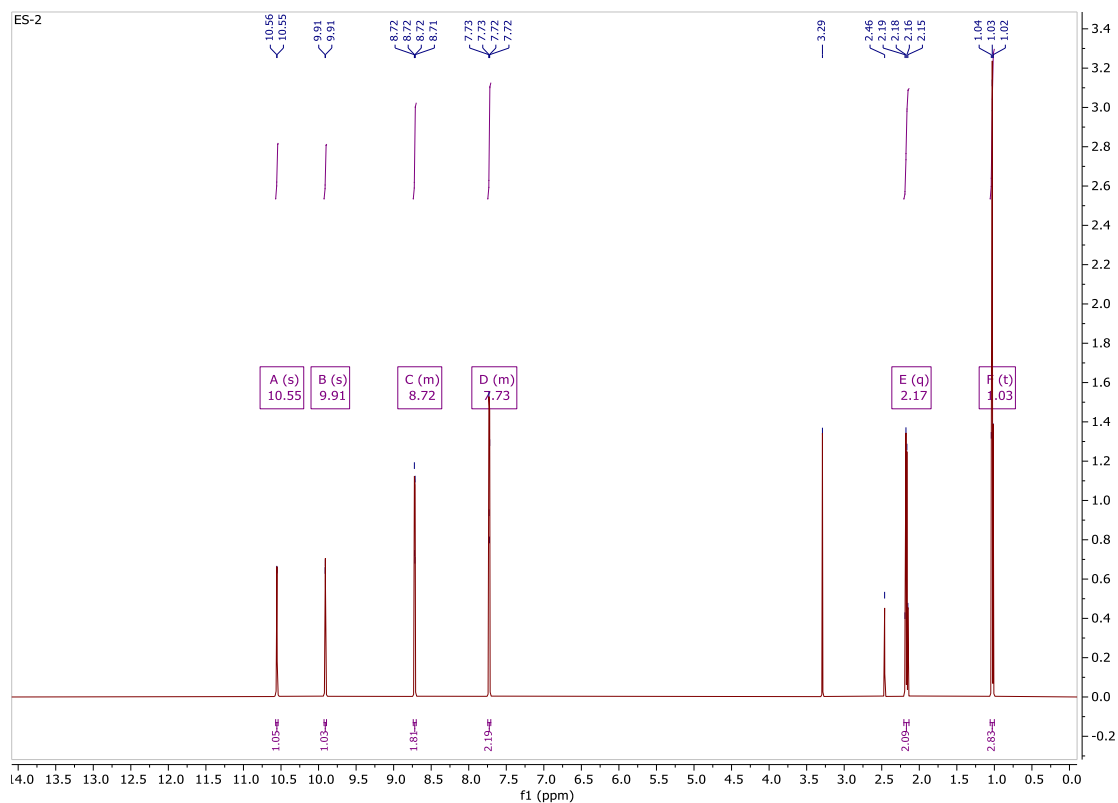
Spektrum 11 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum 2-heptyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**

Spektrum 12 - IR (ATR-Ge) spektrum 2-heptyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**

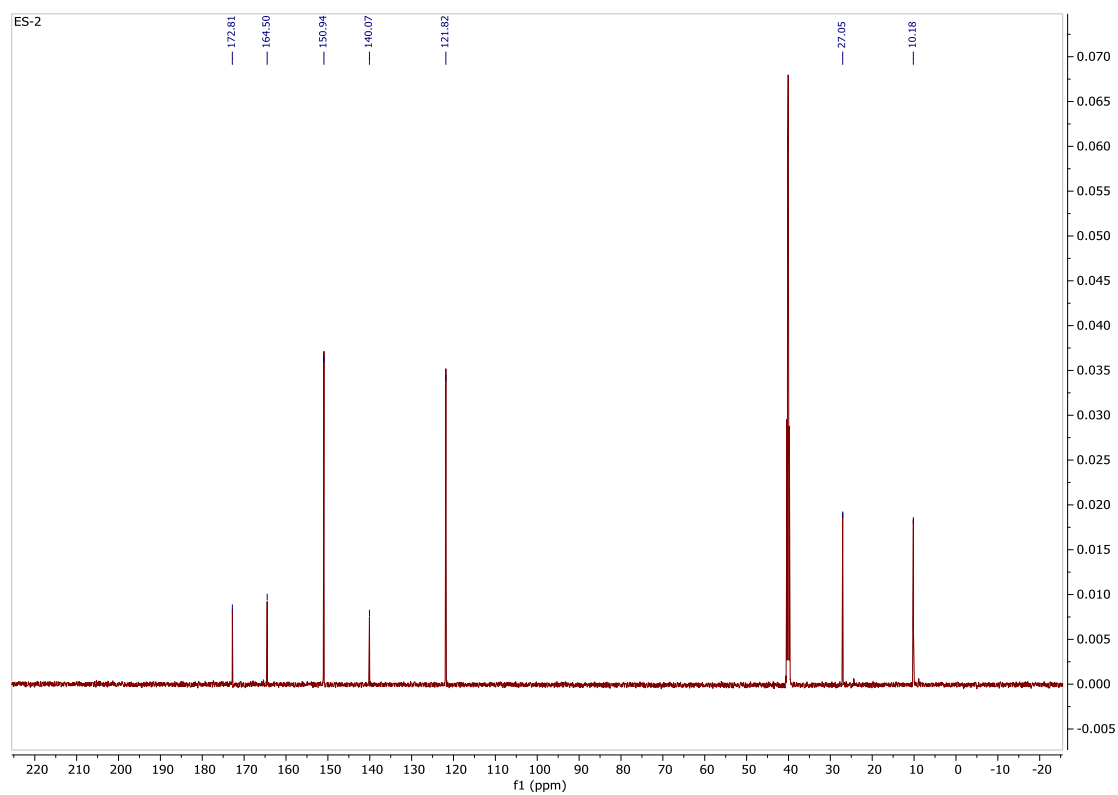
VZOROVÉ SPEKTRÁ ZLÚČENÍN 15b, 15g, 16b, 16g



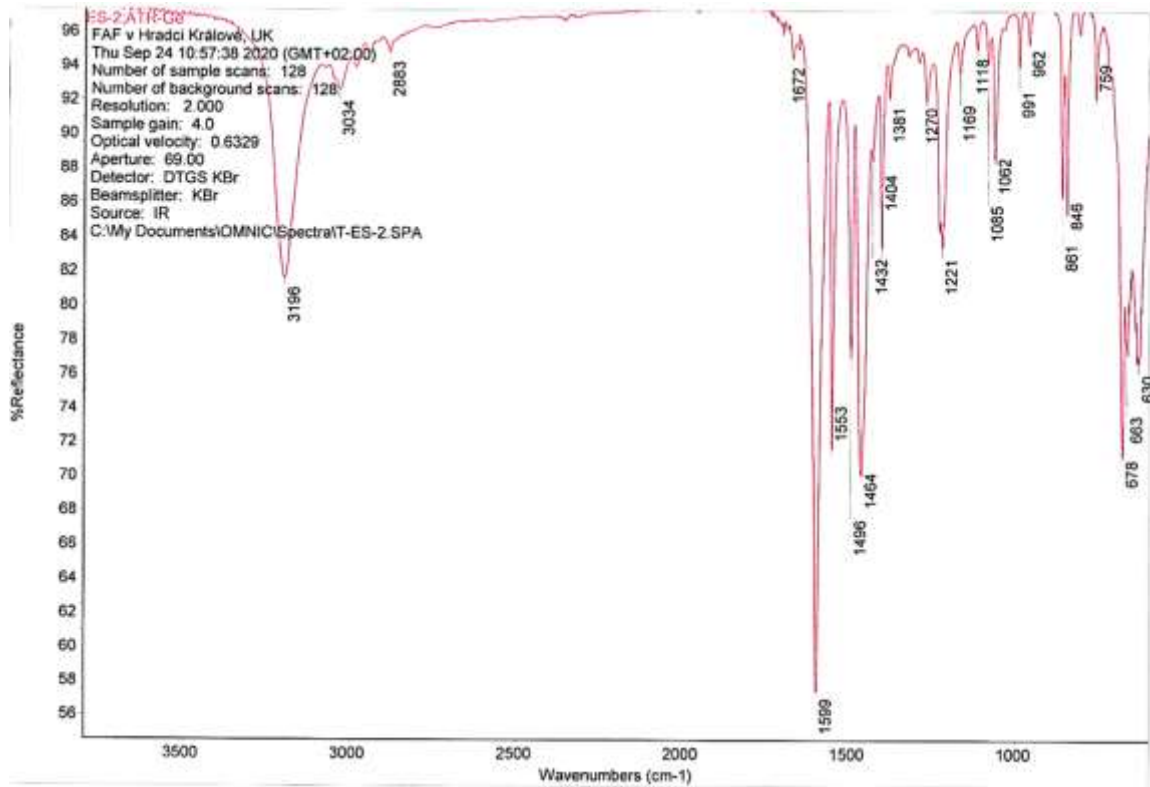
Spektrum 1 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum N^{ϵ} -propionylizonikotinohydrazidu **15b**



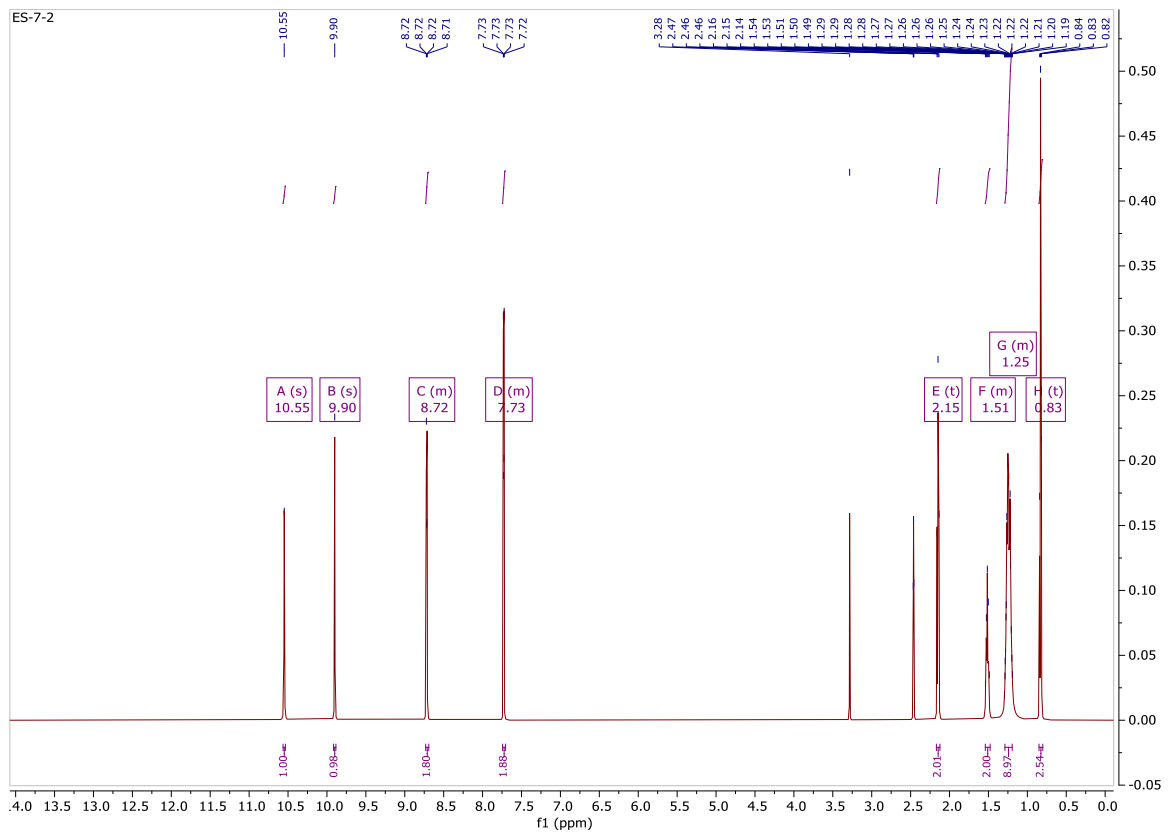
Spektrum 2 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum N^{ϵ} -propionylizonikotinohydrazidu **15b**



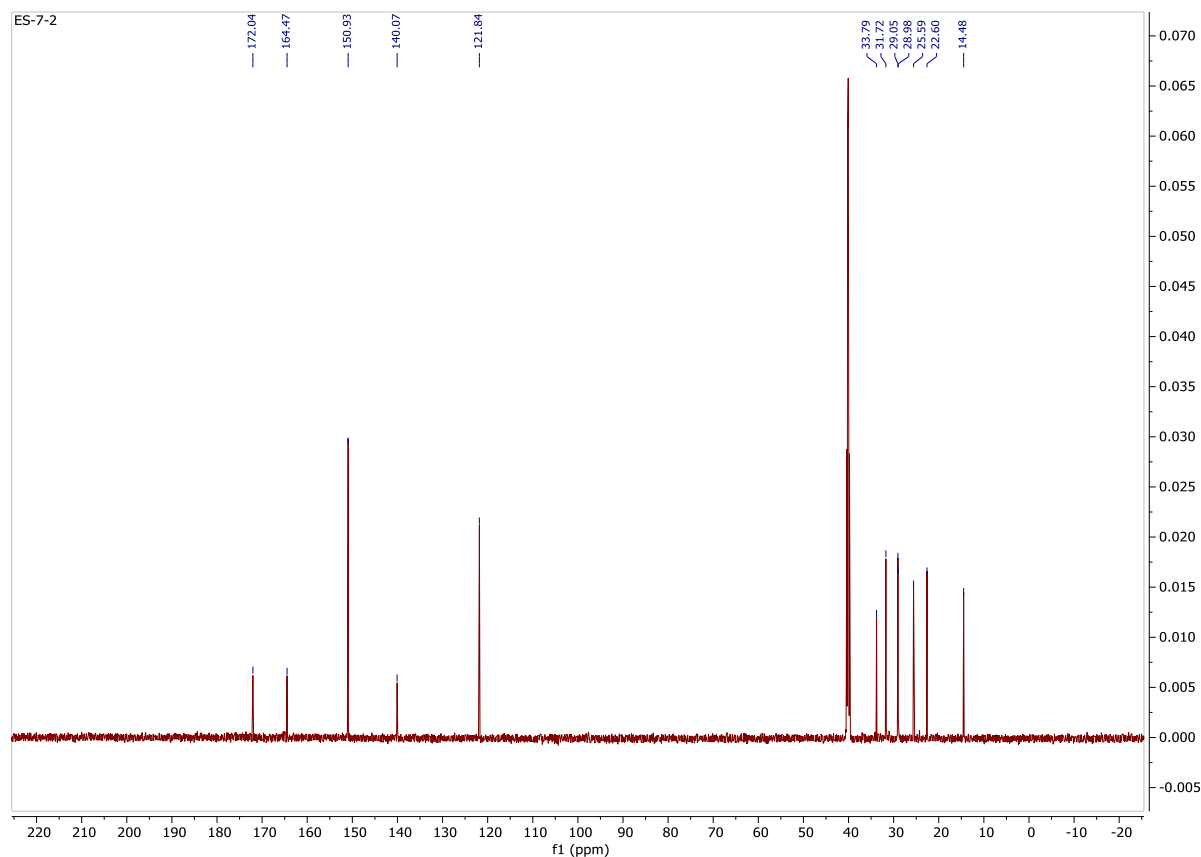
Spektrum 3 - IR (ATR-Ge) spektrum *N'*-propionylizonikotinohydrazidu **15b**



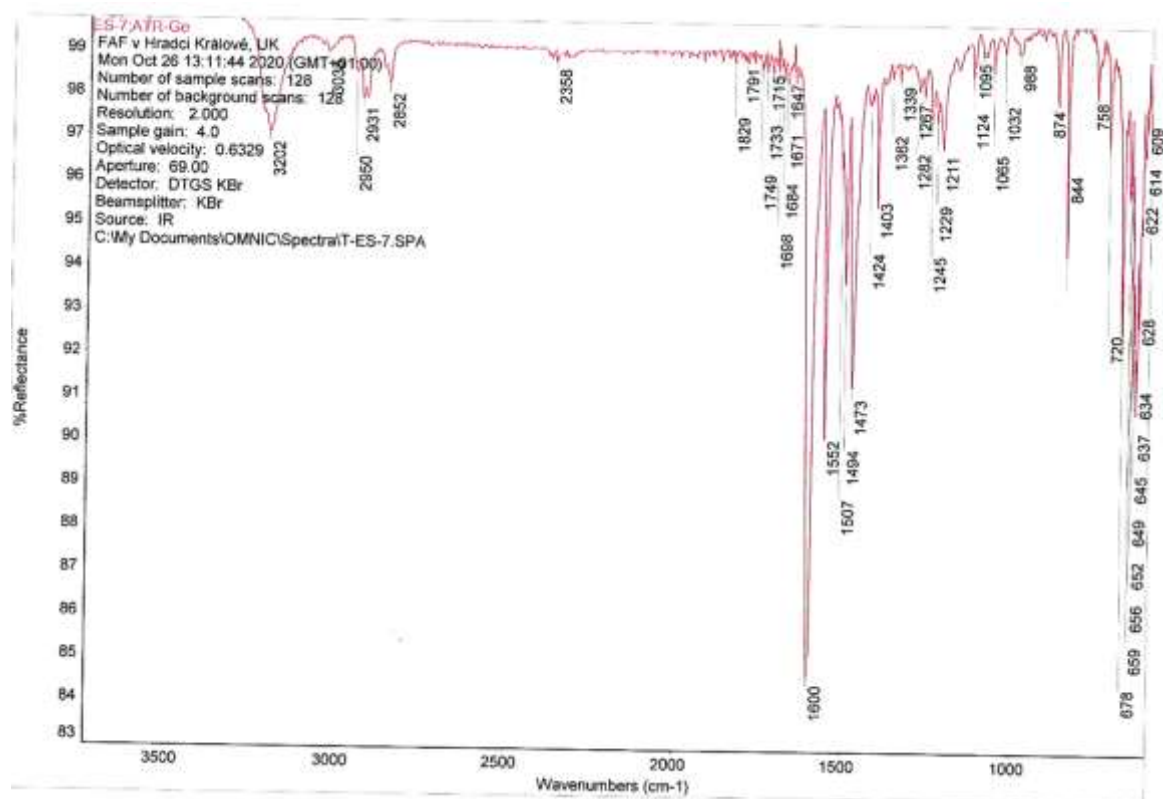
Spektrum 4 - ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) spektrum *N'*-oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**



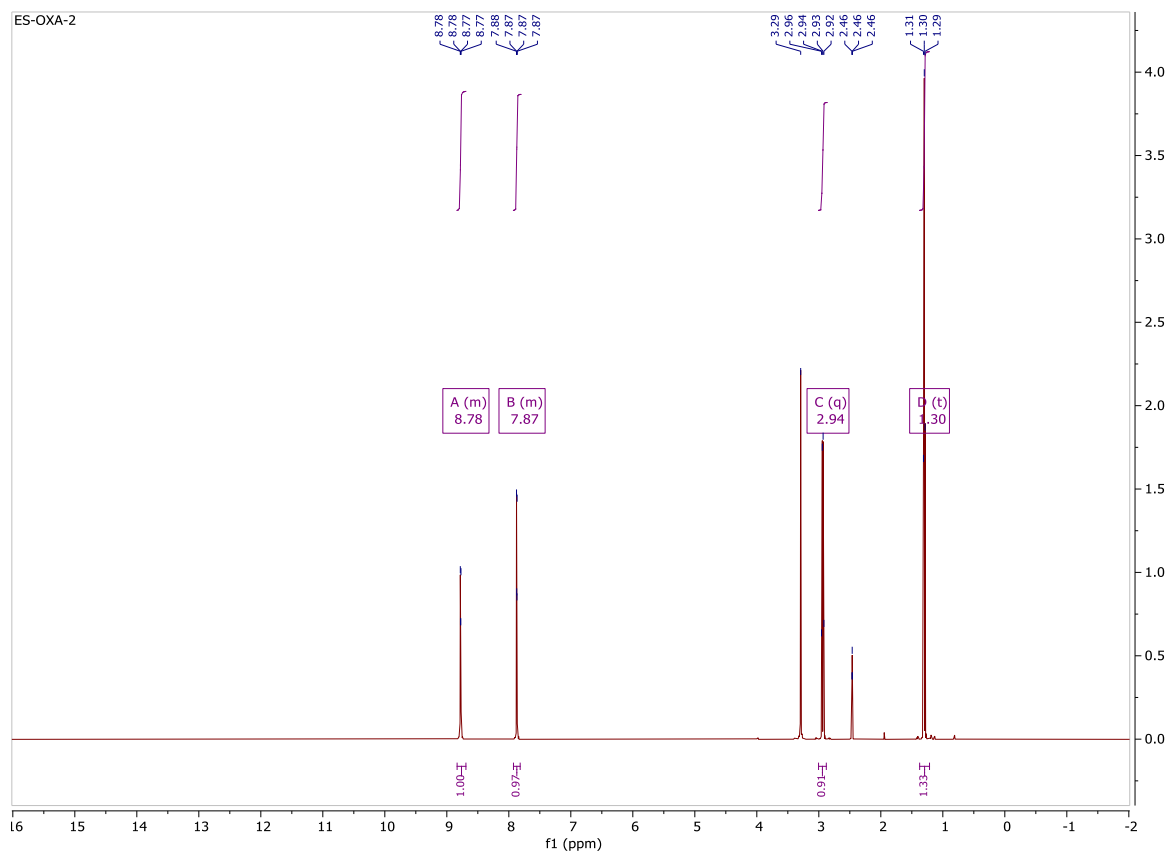
Spektrum 5 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum N'-oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**



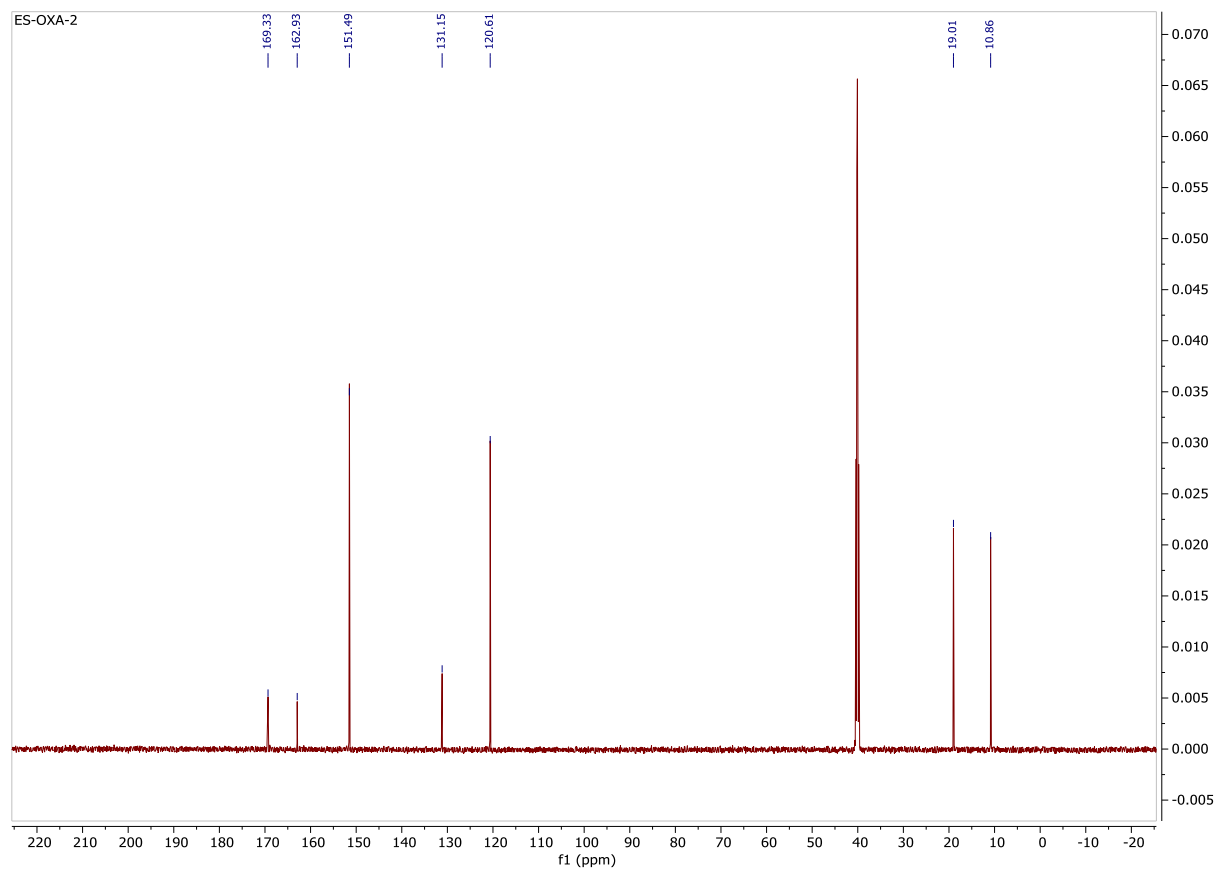
Spektrum 6 - IR (ATR-Ge) spektrum N'-oktanoylizonikotinohydrazidu **15g**



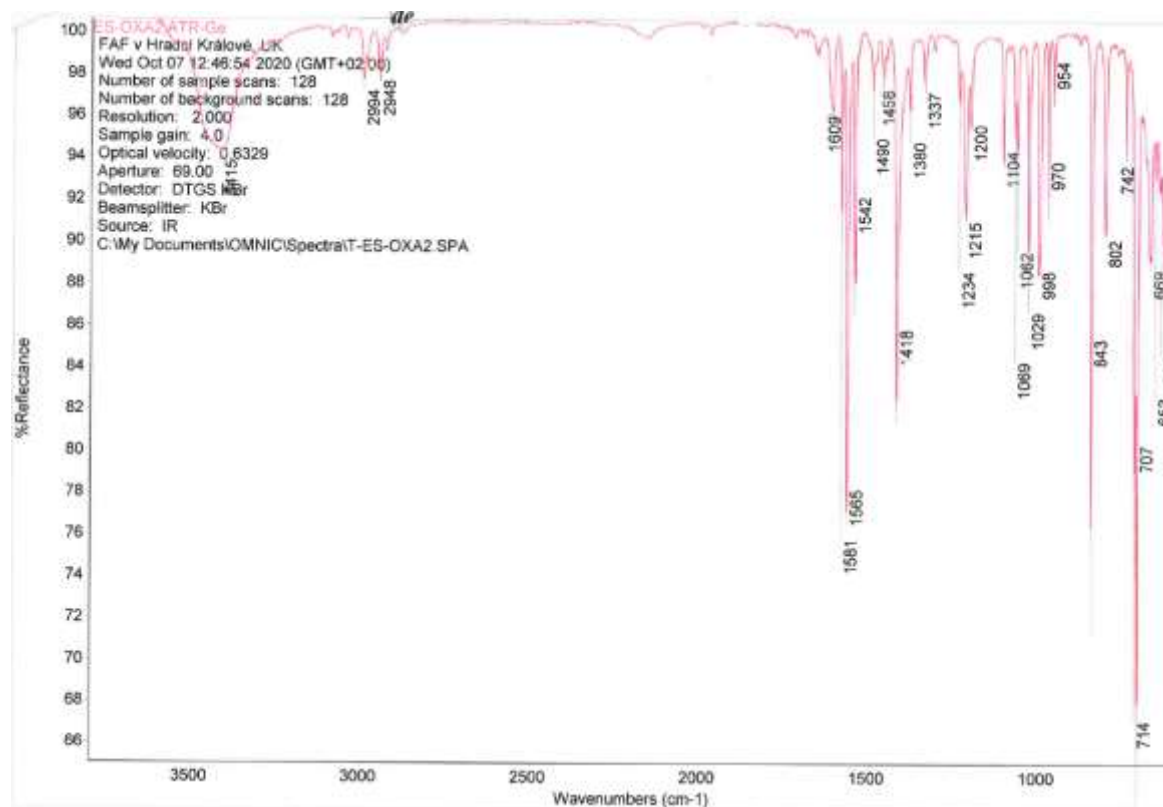
Spektrum 7 - ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) spektrum 2-etyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**



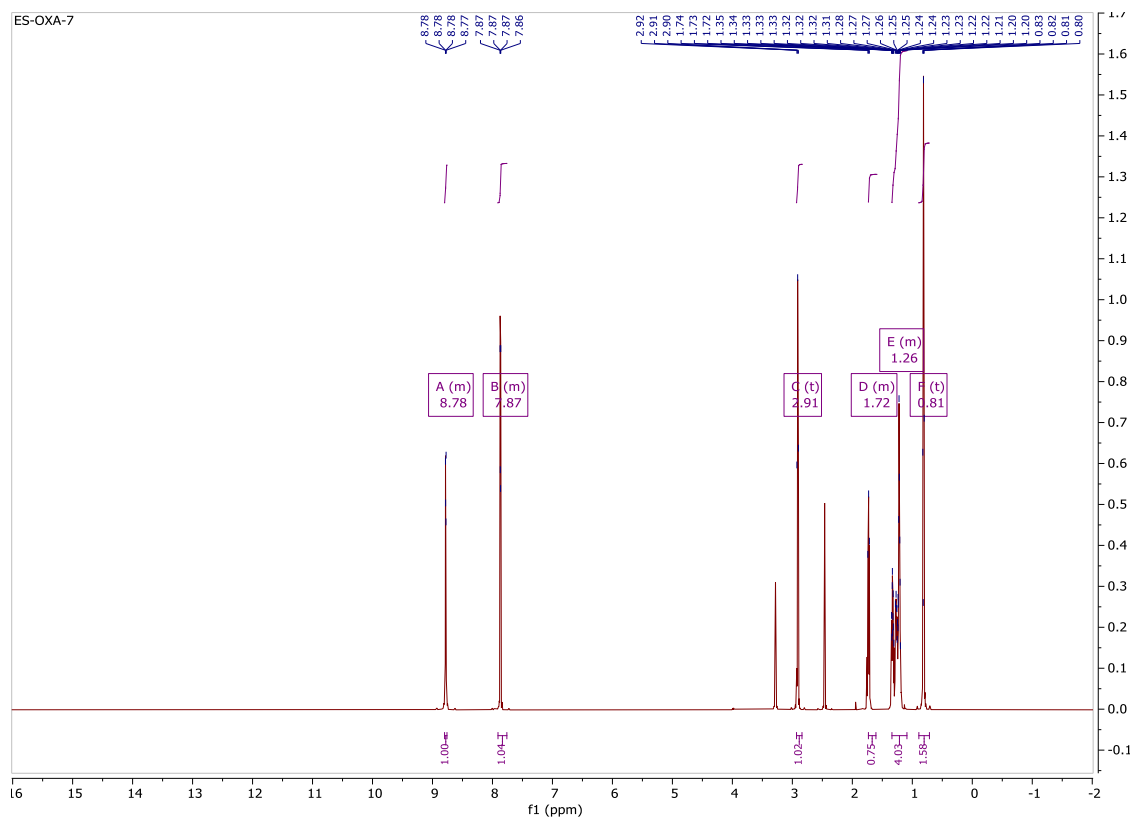
Spektrum 8 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum 2-etyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**



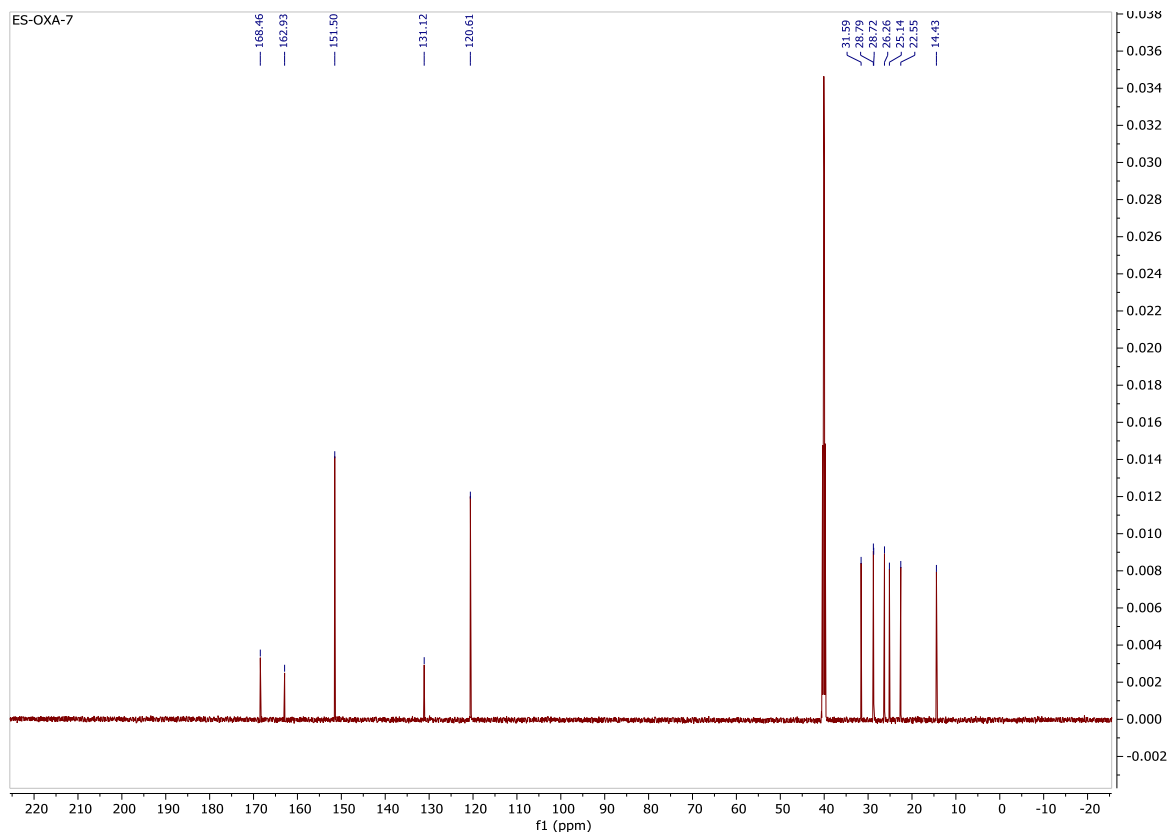
Spektrum 9 - IR (ATR-Ge) spektrum 2-etyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16b**



Spektrum 10 - ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) spektrum 2-heptyl-5-(pyridín-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**



Spektrum 11 - ^{13}C NMR (DMSO, 151 MHz) spektrum 2-heptyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**



Spektrum 12 - IR (ATR-Ge) spektrum 2-heptyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazolu **16g**

