

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



**Studium vztahu mezi strukturou a antimykobakteriální  
aktivitou v sérii dinitrofenyl-substituovaných heterocyklů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D., za odborný dohled, rady, cenný čas a trpělivost, kterou mi věnoval. Dále chci poděkovat Ing. Galině Karabanovich, Ph.D. a Mgr. Marku Macušovi za jejich ochotu a pomocnou ruku při vypracování praktické části.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 2022

Zdeněk Mašek

# OBSAH

ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. TUBERKULÓZA.....	9
2.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	9
2.1.2. <i>Epidemiologie</i> .....	9
2.2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ TUBERKULÓZY.....	10
2.2.1. <i>Klinický obraz nemoci</i> .....	10
2.2.2. <i>Typy onemocnění a rizikové faktory</i> .....	10
2.2.3. <i>Diagnóza</i> .....	11
2.2.4. <i>Terapie</i> .....	11
2.2.4.1. <i>Standartní terapie</i> .....	11
2.2.4.2. <i>Terapie rezistentních forem</i> .....	12
2.3. LÉČIVA VYUŽÍVANÁ K TERAPII TUBERKULÓZY.....	12
2.3.1. <i>Léčiva I. linie</i> .....	13
2.3.1.1. <i>Isoniazid</i> .....	13
2.3.1.2. <i>Rifampicin</i> .....	14
2.3.1.3. <i>Etambutol</i> .....	14
2.3.1.4. <i>Pyrazinamid</i> .....	15
2.3.2. <i>Léčiva II. a III. linie</i> .....	15
2.3.2.1. <i>Fluorochinolony</i> .....	15
2.3.2.2. <i>Bedachilin</i> .....	16
2.3.2.3. <i>Linezolid</i> .....	16
2.3.2.4. <i>Cykloserin a terizidion</i> .....	17
2.3.3. <i>Léčiva čekající na regulační schválení a slibná léčiva ve fázi klinického testování</i> .....	18
2.3.3.1. <i>Delamanid</i> .....	18
2.3.3.2. <i>Pretomanid</i> .....	19
2.3.4. <i>Léčiva ve II. a III. fázi klinických testů</i> .....	19
2.3.4.1. <i>Benzothiazinony</i> .....	19
2.3.4.2. <i>Telacebek</i> .....	20
2.3.4.3. <i>GSK286</i> .....	20
2.4. DINITROFENYL SUBSTITUOVANÉ HETEROCYKLY A JEJICH REVERZNÍ DERIVÁTY.....	21
2.4.1. <i>1-substituované-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoly</i> .....	21
2.4.2. <i>5-substituované-2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazoly</i> .....	22
2.4.3. <i>S-substituované 5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thioly</i> .....	23
3. CÍL PRÁCE.....	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
4.1. PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	25
4.2. TETRAZOLOVÁ SÉRIE (I. SÉRIE).....	25
4.3. OXADIAZOLÁ SÉRIE (II. SÉRIE).....	29
4.4. REVERZNÍ ANALOGA OXADIAZOLŮ (III. SÉRIE).....	32

5.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	42
5.1.	PŘÍPRAVA LÁTEK V TÉTO PRÁCI .....	42
5.2.	VÝSLEDKY ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ ÚČINNOSTI <i>IN VITRO</i> .....	46
6.	ZÁVĚR.....	48
7.	POUŽITÁ LITERATURA .....	49
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	53
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT.....	55
9.1.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	55
9.2.	SEZNAM TABULEK.....	56
9.3.	SEZNAM SCHÉMAT .....	56

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

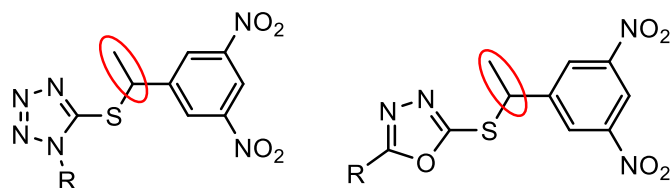
Autor: Zdeněk Mašek

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

Název diplomové práce: Studium vztahu mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v sérii dinitrofenyl-substituovaných heterocyklů

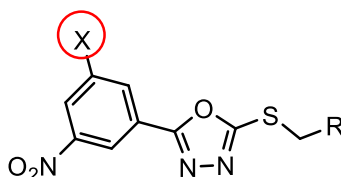
Tuberkulóza je infekční onemocnění se stále vyšší roční incidencí. Odolnost patogenu, jmenovitě mykobakterie *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, k léčbě se stále zvyšuje, a to i proti kombinované terapii. V roce 2020 byla tuberkulóza druhou nejčastější příčinou úmrtí na infekční onemocnění (první bylo onemocnění COVID-19) a vyžádala si přibližně 1,5 milionu obětí. Do budoucna se odhaduje, že kvůli oslabení populace COVIDem-19 tato čísla ještě porostou.

Cílem práce bylo vyvinout deriváty odvozené od dříve studovaných 1*H*-tetrazolů a 1,3,4-oxadiazolů se stericky stíněným atomem síry pomocí methylové substituce (*Obr. I*). Tím by byla síra chráněna před metabolickou oxidací, díky čemuž by se mohla zvýšit aktivita těchto látek proti rezistentním mykobakteriálním kmenům a stejným mechanismem by také mělo dojít k prodloužení jejich biologického poločasu. Byly připraveny dvě série cílových sloučenin, tetrazolová řada a oxadiazolová řada, obě zahrnovaly čtyři sloučeniny, u kterých byla stanovena a porovnána antimykobakteriální aktivita s jejich předlohovými látkami.



*Obr. I – Deriváty 1*H*-tetrazolů (vlevo) a 1,3,4-oxadiazolů (vpravo) s vyznačeným sterickým stíněním*

Jako další byly v rámci třetí série syntetizovány analogy antimykobakteriálně účinných 3,5-dinitrofenyl oxadiazolů, u kterých byla provedena změna jedné nitroskupiny za skupinu halogenovou (*Obr. II*). V blízké budoucnosti bude sledován efekt této substituce na účinek, biologický poločas a další vybrané vlastnosti.



*Obr. II – Analogy 3,5-dinitrofenyloxadiazolů s vyznačenou záměnou nitroskupiny za halogenovou skupinu*

## ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

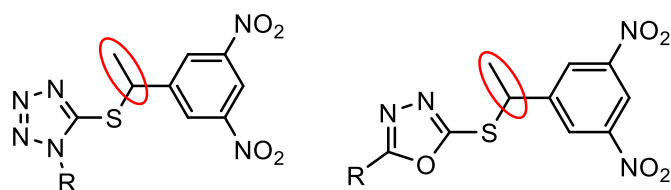
Author: Zdeněk Mašek

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

Title of diploma thesis: Structure-antimycobacterial activity relationships in the series of dinitrophenyl-substituted heterocycles

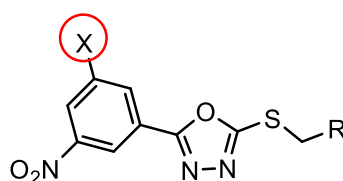
Tuberculosis is an infectious disease with an increasing number of cases each year. Resistance of the pathogen, namely *Mycobacterium tuberculosis*, to the treatment, even against combined therapy keeps increasing. In 2020, tuberculosis was the second most common cause of death by infectious disease after COVID-19 (it claimed 1.5 million lives) and it is also estimated that with COVID-19 weakening the population, these numbers will only grow.

The aim of this work was to develop derivatives of previously studied 1*H*-tetrazoles and 1,3,4-oxadiazoles, with a sterically hindered sulfur atom (*Fig. I*), which may protect them from metabolic oxidation and therefore possibly increase their activity against resistant strains of *M. tuberculosis* as well as other mycobacterial strains and to increase biological half-time of these potential antituberculosis drugs. We prepared two test series, namely 1*H*-tetrazole series and 1,3,4-oxadiazole series both containing 4 compounds, whose antimycobacterial activities were evaluated and the results were compared with their non-sterically shielded parent compounds.



*Fig. I – Derivates of 1*H*-tetrazoles (left) and 1,3,4-oxadiazoles (right) with marked steric hinderance*

As up next, we synthetized a third series, the analogs of the 3,5-dinitrophenyloxadiazole series, in which we have made a substitution of one nitro group for a halogen group (*Fig. II*). The impact of this substitution on antimycobacterial effectivity, biological half-life and other important properties will be evaluated and the results will be compared those of their parent compounds.



*Fig. II – Analogues of the 3,5-dinitrophenyloxadiazoles with marked substitution of one nitro group for a halogen group*

# 1. ÚVOD

Tuberkulóza (TB) je celosvětově rozšířené onemocnění, od roku 1993 vyhlášené Světovou zdravotnickou organizací (WHO, World Health Organization) jako riziko s globálním dopadem. Nejvíce zasaženými oblastmi jsou země jihovýchodní Asie a dále jižní Afriky, jak vyplývá i z údajů o celosvětové incidenci TB v roce 2020 (Obrázek 1). Kromě rostoucí incidence TB je zde i riziko stále častěji se vyskytujících rezistentních forem TB k léčivům první linie<sup>1</sup>.

Další komplikací tohoto onemocnění je, kromě dlouhé doby léčby, která může trvat až v řádu desítek měsíců, i nedostupnost terapie v rizikových oblastech, především v rozvojových zemích. Stejně tak je problematická i samotná adherence k léčbě, jelikož léčiva v ní používaná mají často mnoho nežádoucích účinků. Těmto obtížím nenapomáhá ani fakt, že aktivní forma TB se obvykle vyvíjí u pacientů s oslabeným imunitním systémem, nejčastěji u pacientů s infekcí virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV, Human Immunodeficiency Virus)<sup>1,2</sup>.

Ke kombinaci výše zmíněných faktorů se přidává i nelehký úkol nalezení nových léčiv. Ta by měla mít preferenčně nový mechanismus účinku, čímž by bylo možné se vyhnout riziku zkřížené rezistence, dále by pokud možno měla mít minimální nežádoucí účinky na lidský organismus a být specificky účinná pouze na mykobakteriální kmeny způsobující TB. Pro udržení stoupajícího procenta vyléčených pacientů je tedy potřeba vyvíjet nová léčiva proti TB s unikátním mechanismem účinku a modifikovat léčiva stávající, či pro ně vyvíjet výhodnější lékové formy<sup>1,2</sup>.



Obrázek 1 – Incidence TB ve světě pro rok 2020

Pozn. převzato z Global TB reportu 2021 od WHO<sup>1</sup>



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza je bakteriální infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium (M.) tuberculosis complex*, především obligátně aerobní mykobakterií *M. tuberculosis*, patřící do skupiny k dalším příbuzným mykobakteriím jako jsou *M. africanum*, *M. bovis* a *M. microti*. Ve zdravé populaci je většinou imunitní systém konkrétní osoby schopen původce nemoci zastavit. V tom případě pak nemoc přechází do takzvané latentní fáze, kdy nelze zaznamenat žádné běžné symptomy onemocnění. Ty se však mohou projevit během následujících týdnů, měsíců či dokonce roků, v korelaci s oslabením imunitního systému jedince. U přibližně 10 % nakažených touto latentní formou TB se vyvine aktivní nemoc s příznaky<sup>3,4</sup>.

#### 2.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis* je podobně jako řada dalších patogenů, jako například chřipka, černý kašel nebo onemocnění koronavirem (COVID-19, coronavirus disease 2019), přenášena kapénkově, ovšem ve srovnání se zmíněnými virovými onemocněními je méně nakažlivá a pro přenos je třeba frekventovanějšího a delšího kontaktu s infikovanou osobou. Některé další, méně patogenní kmeny, jako *M. bovis*, se mohou přenášet například požitím infikovaného kravského mléka. Jelikož ale *M. bovis* často napadá i další savce, včetně dobytka, je dnes z důvodu pasterizace mléka v civilizovaných oblastech tento způsob přenosu prakticky nulový<sup>4,5</sup>.

#### 2.1.2. Epidemiologie

*M. tuberculosis* napadá všechny věkové skupiny, nicméně skupinou s nejčastější incidencí onemocnění jsou lidé v produktivním věku. Mezi další rizikovou skupinu patří především lidé s oslabeným či kompromitovaným imunitním systémem, tedy kupříkladu ti procházející radioterapií, nebo lidé nakaženi HIV. Lidé se syndromem získaného selhání imunity (AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome) jsou oproti zdravé populaci přibližně 18krát (15–21krát dle intervalu nejistoty) náchylnější k rozvoji aktivní formy TB. Navíc obě tato onemocnění v kombinaci navzájem zrychlují svojí progresi. Dalšími poměrně významnými faktory zvyšující riziko nákazy TB jsou: alkoholismus (3,3násobné riziko), podvýživa (3krát vyšší riziko), pravidelné kouření (s přibližně 1,6krát vyšším rizikem), dále také diabetes, kde je možné pozorovat zvýšenou rizikovost v kombinaci především s COVIDem-19. V roce 2020 si TB vyžádala přes 1,5 milionů mrtvých, a tak šlo o druhou nejčastější příčinu úmrtí na infekční agens hned po COVIDu-19 a o 13. nejčastější příčinu úmrtí na světě<sup>1</sup>. Z tohoto počtu bylo asi

215 tisíc úmrtí na HIV asociovanou s TB. Přes 95 % těchto úmrtí bylo zdokumentováno především v rozvojových zemích (viz 1. Úvod).

## **2.2. Současný stav poznání tuberkulózy**

### **2.2.1. Klinický obraz nemoci**

Symptomy infekce TB se liší podle toho, jaká tkáň je mykobakterií napadena. Nejběžnější forma TB je plicní infekce, která se projevuje snížením chuti k jídlu, ztrátou hmotnosti, nočním pocením, zvýšenou teplotou, extrémní únavou a vyčerpáním. Neméně důležitým symptomem je často produktivní, přetrvávající kašel, který může být i s příměsí krve a stejně tak se může objevit zhoršující se a neustávající dušnost<sup>3,6</sup>.

Kromě plicní tkáně mohou bakterie napadat i další části těla, konkrétně například lymfatické uzliny, kosti, klouby, zažívací ústrojí, močový měchýř, reprodukční systém, mozek či další části nervového systému. V tomto případě se jedná o mimoplicní formu infekce, které jsou daleko běžnější u lidí s velmi oslabeným imunitním systémem. Tato forma se může projevat v závislosti na lokalizaci například přetrvávajícími nateklými lymfatickými uzlinami, bolestí v oblasti abdomenu, bolestivostí a ztrátou pohyblivosti v napadeném kloubu nebo kosti, zmatením, přetrvávající bolestí hlavy či záchvaty<sup>6</sup>.

### **2.2.2. Typy onemocnění a rizikové faktory**

Onemocnění TB se rozčleňuje na aktivní, latentní a reaktivovanou formu. Aktivní projev se u nemocného manifestuje v reálném čase a často je pro pacienta prvním důvodem pro návštěvu lékaře<sup>1,3</sup>.

Jako latentní infekce je označován stav, kdy v lidském organismu *M. tuberculosis* přežívá v dormantním – spícím stadiu, co se může dít i po řadu let. Pacient je v této fázi bezpříznakový a diagnóza je proto obtížnější<sup>3</sup>.

K opětovnému vzplanutí nemoci z dormantního stádia může dojít za nepříznivých podmínek takzvanou endogenní reaktivací této subklinické latentní infekce. Jako nepříznivé podmínky jsou označovány vysoký věk jedince, alkoholismus, oslabení imunitního systému například léčbou, zářením, či jinými chorobami, a v neposlední řadě také špatnými životními a sociálními podmínkami. Z toho vyplývá, že závažným rizikovým faktorem je dlouhodobé imunokompromitující onemocnění, stresující situace, špatné či slabé sociální zázemí apod.<sup>4</sup>.

Méně častou formou nákazy je exogenní superinfekce, kdy dojde k masivní expozici člověka s TB bakterií s následným vyvoláním onemocnění. v tomto případě jsou v největším riziku osoby v blízkém a dlouhodobém kontaktu s nemocnou osobou<sup>1,4</sup>.

### 2.2.3. Diagnóza

Podezření na aktivní formu TB je ve většině případu diagnostikováno pouze na základě příznaků, následně se provádí rentgen a mikroskopický či kultivační test ze sputa, samotná kultivace může zabrat i několik týdnů, jelikož *M. tuberculosis* je pomalu se dělící organismus<sup>3</sup>.

Latentní forma sice není infekční, nicméně diagnóza latentní infekce je důležitá pro prevenci a redukci počtu aktivní formy TB. Oproti diagnostice aktivní formy jde o poněkud složitější proces. Je možné využít dva způsoby detekce, a to buď tuberkulinový kožní test nebo interferon- $\gamma$  release assays test (IGRA). Jediná používaná forma kožního testu je takzvaný Mantouxův test. Existuje u něj však riziko falešně pozitivní odpovědi, při očkování diagnostikovaného pacienta vakcínou Bacillus Calmette–Guérin, ale také falešně negativního výsledku, a to u pacientů se špatnou funkcí imunitního systému. Další metodou v pořadí je poté radiogram, který definitivně určí, zdali má pacient skutečně latentní formu TB. Při diagnóze TB se u rizikových případů provádí také identifikace vyvolávajícího kmene s následným testem citlivosti k léčivům 1. linie pro zjištění případné rezistence<sup>3,7</sup>.

Vzhledem k tomu, že *M. tuberculosis* napadá i další mimoplicní tkáně v organismu, využívají se minoritně pro diagnózu jak metody neinvazivní (výpočetní tomografie, magnetická rezonance, ultrazvukový sken), tak i metody invazivní. Kromě vzorku ze sputa lze provádět testy z krve, moči, případně mozkomíšního moku, kdy je vzorek nabírán lumbální punkcí<sup>3,7</sup>.

### 2.2.4. Terapie

#### 2.2.4.1. Standartní terapie

Obecně je v léčbě TB, jako i u jiných onemocnění, důležité brzké rozpoznání nemoci a co nejdřívější zahájení léčby. Ta je ovšem dlouhodobá, kdy je pacient léčen minimálně po dobu čtyř měsíců (dle nových doporučení WHO<sup>8</sup>), klasicky však terapie dosahuje délky šesti měsíců, a je poměrně náročná. Z těchto důvodů je důležité udržet maximální adherenci pacienta k léčbě, jelikož při neúplném dokončení terapie se kromě rizika rezistence velmi výrazně zvyšuje i riziko opětovného propuknutí nemoci<sup>1,9</sup>. Běžná léčba nerezistentních kmenů TB se řídí lokálními doporučeními, a především doporučením WHO<sup>10</sup>, které pacienty řadí do čtyř kategorií dle charakteru a rozsahu onemocnění.

Mezi léčiva první volby se řadí tzv. antituberkulotika (AT) 1. linie, mezi které patří rifampicin, isoniazid, etambutol a pyrazinamid. Ty jsou podávány ve fixních dávkách pro lepší adherenci k léčbě a snížení nežádoucích účinků (NÚ). Léčba je rozdělena na iniciální fázi prováděnou za hospitalizace a pokračovací ambulantní fázi. Iniciální fáze je zpravidla dvouměsíční, za užívání čtyř až pěti AT první linie, s cílem snížit mykobakteriální nálož v zánětlivých ložiscích. Terapie pokračuje ambulantní fází mimo nemocniční prostředí

nejčastěji po dobu čtyř měsíců, s využitím dvou až tří léčiv se sterilizačním efektem na mykobakterie. V případě napadení dalších tkání, například nervové, ale i jiných, se léčba prodlužuje na dvanáct měsíců s úpravou dávkování. Aby bylo předcházeno riziku vzniku lékové rezistence nesprávným podáním AT, měla by být léčba kontrolována a AT by měla být podávána v předepsané fixní kombinaci<sup>3,11,12,13</sup>.

#### **2.2.4.2. Terapie rezistentních forem**

Léková rezistence se u TB obecně nejčastěji objevuje při nesprávném předepisování (jak jednotlivých léčiv, tak jejich dávek) poskytovatelem zdravotní péče, při nesprávném užívání léčiv ze strany pacienta (špatná adherence zahrnující špatný čas podání, špatně užitou dávku – nadužívání i podužívání, včetně předčasného ukončení léčby – diskontinuace), ale také při provádění terapie nekvalitními léčivy<sup>1</sup>.

Rezistentní formou TB onemocní ročně 500 tisíc lidí, ze kterých má pouze každý třetí přístup k terapii, navíc pouze 56 % těchto pacientů je úspěšně vyléčeno. Podle počtu rezistencí na jednotlivá AT lze TB dělit na rifampicin rezistentní TB, multilékově rezistentní TB (MDR-TB) bez citlivosti na isoniazid a rifampicin, a na extenzivně rezistentní formu (XDR-TB), kdy patogen není citlivý na isoniazid, rifampicin, fluorochinolony, a dokonce ani na některé z léčiv podávané parenterálně (kanamycin, amikacin, kapreomycin a další)<sup>1,14</sup>.

Léčba MDR-TB trvá v lepších případech přibližně 9 měsíců, ale pokud je pacient i nadále mikroskopicky pozitivní, může se léčba protáhnout na mnohem delší období, a to až na několik let. Stejně tak léčba XDR-TB může trvat ve vážnějších případech i přes 2 roky<sup>1,9</sup>.

Terapie těchto rezistentních forem, je náročná především v tom, že počet AT, které lze použít, je velmi omezený. Každý pacient je proto léčen individuálním léčebným režimem i za použití léčiv neregistrovaných v dané zemi. Ve většině případů se navíc jedná o rozsáhlé nálezy při aktivní formě onemocnění, s masivním vylučováním mykobakterie detekovatelných již mikroskopickým vyšetřením. Tím se pacient stává závažným infekčním rizikem pro své okolí i pro ošetřující personál. Z toho důvodu je po těchto nemocných vyžadována dokonalá, několikaměsíční, ale zároveň přijatelná forma izolace s adekvátním sociálním zázemím<sup>13,14</sup>.

I přes léčbu aplikovanou dle doporučených standardů WHO zůstávají nemocní řadu měsíců trvale mikroskopicky pozitivní. U části pacientů je pak operační léčba s odstraněním infekčního ložiska – nejčastěji tuberkulózní kaverny – jedinou život zachraňující léčbou<sup>14</sup>.

### **2.3. Léčiva využívaná k terapii tuberkulózy**

Doporučení WHO v přístupu léčby TB rozděluje používané AT do několika linií<sup>10</sup>. V současnosti čekají na schválení trhu nové léčivé látky a další slibné molekuly se nachází

ve II. a III. fázi klinického testování. V následujících kapitolách budou tyto skupiny včetně do nich zařazených léčiv a molekul popsány podrobněji<sup>15</sup>.

V tabulce níže (*Tabulka 1*) můžeme vidět rozdělení léčiv využívaných proti MDR-TB, které bylo publikováno WHO v roce 2020. Pro roky 2021 a 2022 zůstalo beze změn, došlo pouze k úpravě léčebných režimů ve smyslu dávek, délky terapie a změně preferencí jednotlivých léčiv<sup>16</sup>. Tabulka 1 obsahuje i nová léčiva doporučená k podání perorálně (PO) proti MDR-TB. WHO aktuálně doporučuje pro jednotlivé pacienty různé trvající režimy, kdy se mají podávat až pět kombinací látek a to: všechna tři léčiva ze skupiny A, ze skupiny B jedno nebo dvě léčiva a ze skupiny C jedno léčivo pro doplnění pěti kombinací, pokud nelze užít léčivo ze skupiny A či B<sup>9</sup>.

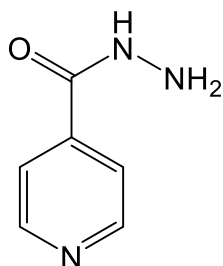
*Tabulka 1 – Rozdělení léčiv proti MDR-TB do skupin dle doporučení WHO<sup>9</sup>*

<i>Skupina</i>	<i>Léčiva</i>
<i>A</i>	levofloxacin nebo moxifloxacin, bedaquilin a linezolid
<i>B</i>	klofazimin, cykloserin nebo terizidon
<i>C</i>	etambutol, delamanid, pyrazinamid, imipenem–cilastatin nebo meropenem, amikacin (nebo streptomycin), etionamid nebo protionamid, a p-aminosalicylová kyselina

### **2.3.1. Léčiva I. linie**

#### **2.3.1.1. Isoniazid**

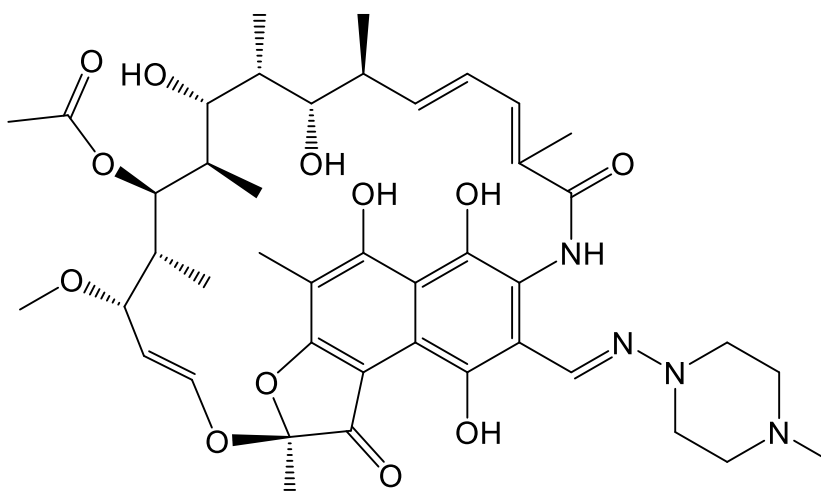
Isoniazid (*Obrázek 2*) se používá jak na latentní, tak na aktivní formy TB, často v kombinaci s dalšími AT. Isoniazid je proléčivo, proto aby byl účinný, musí být aktivován specifickou bakteriální katalázou. Tato aktivace je asociovaná s mykobakteriální Fe-katalázou-peroxidázou. Aktivovaný komplex isoniazidu inhibuje tvorbu mykolových kyselin, které jsou esenciální pro tvorbu bakteriální buněčné stěny, dále také interaguje s tvorbou deoxyribonukleové kyseliny (DNA), lipidů, sacharidů a nikotinamidadeninukleotidu uvnitř bakterie<sup>17</sup>. Proti rychle se množící bakterii působí baktericidně, proti pomalu se množící bakteriostaticky<sup>18</sup>. Léčivo se podává buď každodenně PO v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti na den, s maximální denní dávkou (DD) 300 mg/den. Případně také v režimu 1–3x týdně s dávkou 15 mg/kg tělesné hmotnosti, kdy maximální jednotlivá dávka pak nesmí překročit 900 mg<sup>19</sup>.



Obrázek 2 – Isoniazid

### 2.3.1.2. Rifampicin

Rifampicin (Obrázek 3), nebo dle americké nomenklatury Rifampin, je semisyntetické antibiotikum, produkované kmenem *Streptomyces mediterranei*. Má poměrně široké antibakteriální spektrum a vykazuje aktivitu proti vícero mykobakteriálním kmenům. U organismů, které jsou na rifampicin citlivé inhibuje aktivitu DNA-dependentní polymerázy ribonukleové kyseliny (RNA) tím, že tvoří stabilní komplexy s tímto enzymem. Nově vzniklý komplex svým účinkem dále potlačuje iniciaci syntézy RNA, savčí analogický enzym tímto léčivem ovlivňován není. Rifampicin je svým účinkem baktericidní a funguje jak na intracelulární, tak na extracelulární formy. Vzhledem k vzrůstající rezistenci se dnes využívá především na citlivé kmeny *M. tuberculosis*, ale dále také kupříkladu na *Pseudomonas aureginosa* nebo *M. leprae*<sup>20</sup>. Běžná dávka k léčbě TB infekce se podává v režimu 10 mg/kg tělesné hmotnosti denně nebo 10 mg/kg tělesné hmotnosti s frekvencí dvakrát týdně kdy DD nesmí překročit 600 mg<sup>21</sup>.

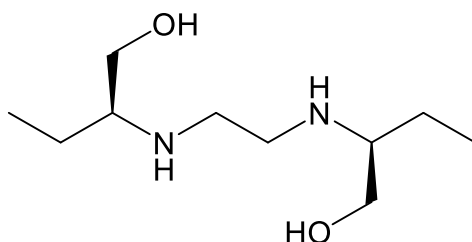


Obrázek 3 – Rifampicin

### 2.3.1.3. Etambutol

Etambutol (Obrázek 4) je indikován do kombinace především na pulmonální formy TB. Do bakterie proniká difúzí, kde poté inhibuje enzym arabinosyltransferázu (podtypy EmbA, B, C), čímž blokuje syntézu dvou důležitých komponentů buněčné stěny – arabinogalaktanu a

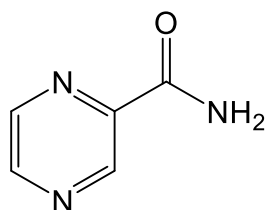
lipoarabinomannanu, navíc blokuje buněčné dělení<sup>22</sup>. Jednou z jeho nevýhod je, podobně jako u dalších AT, riziko velmi častých NÚ, v tomto případě jde konkrétně o vyvolání jaterní toxicity, optické neuritidy (její vznik je vzácnější) a dalších<sup>23</sup>. Dávkování v iniciačním režimu je po 15 mg/kg/den, při již předcházející TB infekci se podává 25 mg/kg denně a dále se dávka po 60 dnech snižuje na 15 mg/kg denně. Maximální dávky se liší dle režimu (podávání 1x denně vs. 2x či 3x týdně) a váhy pacienta a pohybují se od 800 mg/den až ke 4 g/den<sup>24</sup>.



Obrázek 4 – Etambutol

#### 2.3.1.4. Pyrazinamid

Léčivo pyrazinamid (Obrázek 5) difunduje do aktivní *M. tuberculosis*, která exprimuje pyrazinamidázový enzym, přeměňující pyrazinamid na jeho aktivní formu – kyselinu pyrazin-2-karboxylovou. U ní se po několika testech a spekulacích prokázalo, že se v bakterii v přítomnosti mírně kyselého prostředí váže na syntázu mastných kyselin, čímž zabraňuje tvorbě mastných kyselin v bakterii. Dále se také předpokládá, že nahromadění pyrazinové kyseliny narušuje membránový potenciál a tím i produkci energie. Účinek pyrazinamidu na dormantní mykobakterii je vysvětlen ještě dalším účinkem, a tím je inhibice proteosyntézy přes vazbu na ribozomální protein S1 (RpsA)<sup>25</sup>. Dávkuje se buď 15–30 mg/kg hmotnosti PO každý den nebo 50 mg/kg 2x týdně, maximální dávka nesmí překročit 2 g za den. U pacientů nakažených HIV se DD může zvýšit na 20–40 mg/kg<sup>26</sup>.



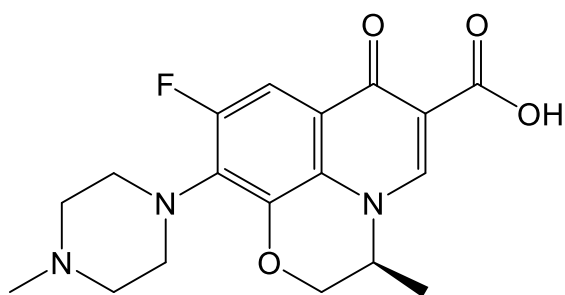
Obrázek 5 – Pyrazinamid

### 2.3.2. Léčiva II. a III. linie

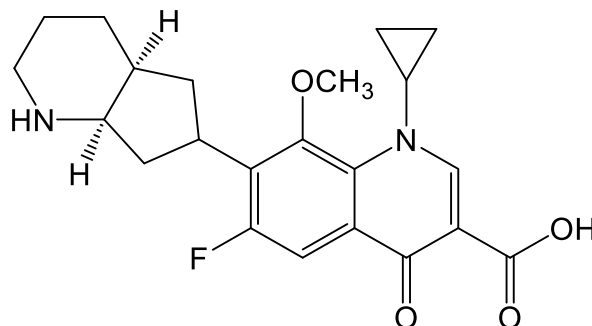
#### 2.3.2.1. Fluorochinolony

Jedni ze zástupců z řad léčiv druhé linie jsou fluorochinolony, konkrétně levofloxacin (Obrázek 6) a moxifloxacin, (Obrázek 7). Obě tyto látky mají na TB baktericidní účinek. Mechanismus účinku spočívá v inhibici dvou klíčových enzymů, a to topoisomerázy II

(DNA gyrázy) a topoisomerázy IV, čímž efektivně inhibují replikaci, transkripci a opravy v bakteriální DNA. Přestože afinita k bakteriálním enzymům je až 100krát vyšší než k těm savčím, vyskytuje se u těchto léčiv mnoho častých nežádoucích účinků<sup>27</sup>. Další nevýhodou je i častý vznik rezistence, která bývá mezi touto skupinou léčiv zkřížená. Moxifloxacin se podává PO nebo intravenózně v dávce 400 mg na den<sup>28</sup>. Levofloxacin je užíván v dávkách 250-750 mg denně PO<sup>29</sup>.



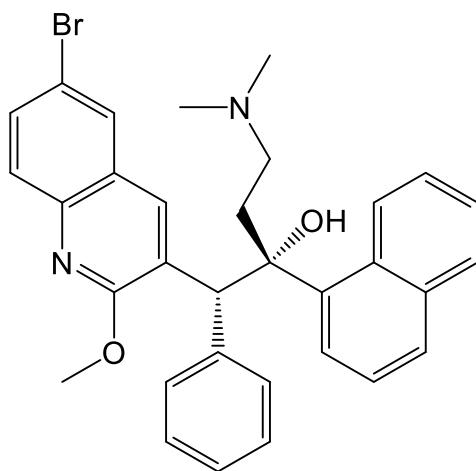
Obrázek 6 – Levofloxacin



Obrázek 7 – Moxifloxacin

### 2.3.2.2. Bedachilin

Bedachilin (Obrázek 8) je jedna z nejnovějších látek druhé linie určená především do kombinace k léčbě MDR-TB. Mechanismus účinku této látky spočívá v inhibici mykobakteriálního enzymu adenosintrifosfát (ATP) syntázy, který je nezbytný pro tvorbu ATP, tedy pro energetický metabolismus<sup>30</sup>. Při terapii se užívá nejdříve 400 mg PO 1x denně po dobu dvou týdnů, dále pak 200 mg 3x týdně až do ukončení terapie (tedy až dalších 21 týdnů)<sup>31</sup>.



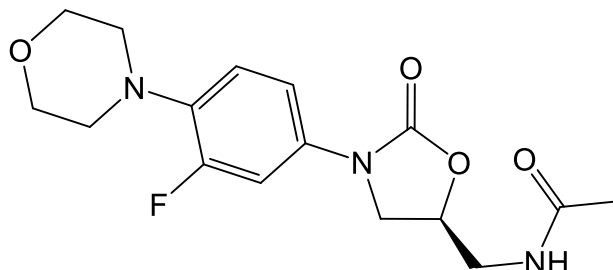
Obrázek 8 – Bedachilin

### 2.3.2.3. Linezolid

Linezolid (Obrázek 9) v mykobakterii interaguje s translací proteinů, váže se na 23S komplex 50S ribozomální podjednotky a zabraňuje tím formování iniciačního komplexu, který je nezbytný pro proteosyntézu uvnitř bakterie. Mutace bakteriální 23S ribozomální RNA ovšem



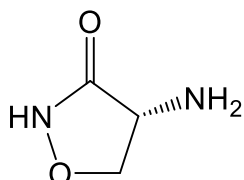
mohou způsobit rezistenci, která byla prozatím pozorovaná například u kmenu *Staphylococcus aureus*<sup>32</sup>. Obvyklá dávka je 600 mg PO 1x denně, často však bývá redukována na 300 mg z důvodu nežádoucích účinků<sup>33</sup>.



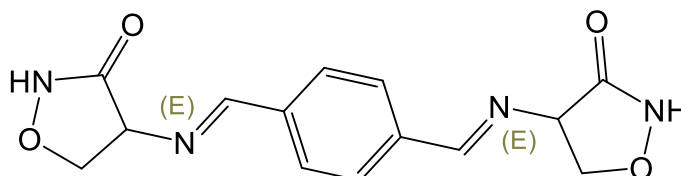
Obrázek 9 – Linezolid

#### 2.3.2.4. Cykloserin a terizidion

Cykloserin (Obrázek 10) je analogem aminokyseliny D-alaninu. v bakterii interaguje s prvními kroky syntézy buněčné stěny v cytoplazmě, a to kompeticí se dvěma enzymy, L-alanin racemázou a D-alanylalanin syntázou, která vytváří pentapeptid nezbytný pro syntézu buněčné stěny<sup>34</sup>. Při terapii aktivní TB se podává prvních 14 dní 250 mg 2x denně, dále se pak může dávka až zdvojnásobit (tedy 500 mg po 12 h) do konce terapie, která může trvat až 24 měsíců<sup>35</sup>. Níže je vyobrazen také derivát cykloserinu, terizidion (Obrázek 11), který má stejný mechanismus účinku a dává se obdobně<sup>36</sup>.



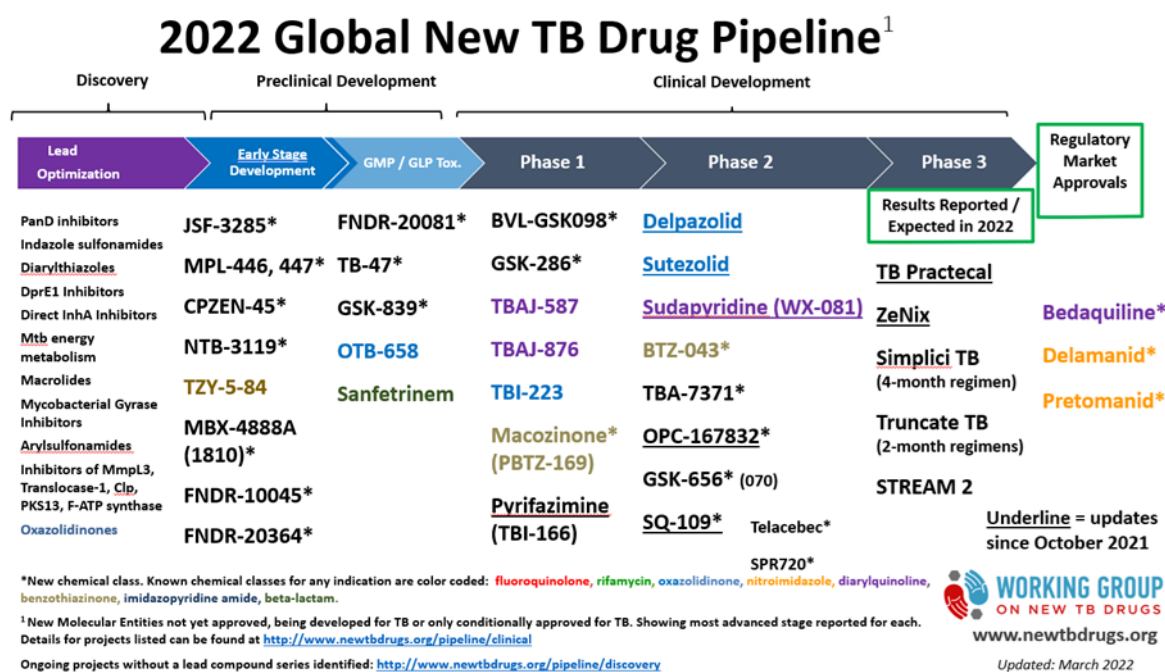
Obrázek 10 – Cykloserin



Obrázek 11 – Terizidion

### 2.3.3. Léčiva čekající na regulační schválení a slibná léčiva ve fázi klinického testování

V současnosti probíhá vývoj potenciálních AT, kde aktuální progres slibných molekul zobrazuje Obrázek 12. Vybrané struktury budou představeny v podkapitolách níže.

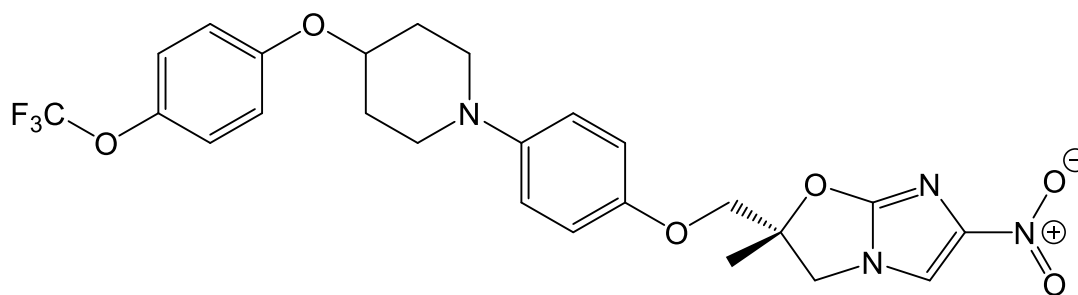


Obrázek 12 – Přehled vyvíjených AT ve stádiích preklinického a klinického vývoje, včetně AT čekajících na schválení

Převzato z Working group on new TB drugs<sup>15</sup>

#### 2.3.3.1. Delamanid

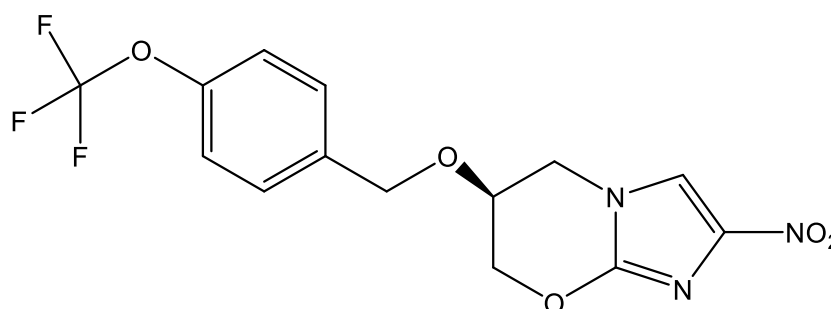
Delamanid (Obrázek 13) je prolečivo, které je transformováno mykobakteriální deazaflavin F<sub>420</sub>-dependentní nitroreduktázou. Následně poté inhibuje syntézu několika druhů mykolových kyselin, což má za následek vyčerpání komponent pro tvorbu buněčné stěny bakterie, a to vede k její následné destrukci. Používá se především v kombinaci proti MDR-TB<sup>37</sup>, přičemž DD je 100 mg 2x denně po dobu 24 týdnů (nehledě na hmotnost, s tím, že vyšší dávky nesou větší riziko výskytu NÚ<sup>38</sup>)<sup>39</sup>.



Obrázek 13 – Delamanid

### 2.3.3.2. Pretomanid

Obdobný mechanismus účinku jako u delamanidu se předpokládá u strukturně podobného léčiva pretomanidu (Obrázek 14). Ten se v trojrežimu s bedachilinem a linezolidem ukázal jako velmi účinný proti XDR-TB a MDR-TB. Bohužel s jeho používáním vzniká poměrně velké riziko myelosuprese, hepatotoxicity a prodloužení QT intervalu<sup>40</sup>. V již zmíněném trojrežimu se dávákuje 200 mg po dobu 26 týdnů<sup>41</sup>.

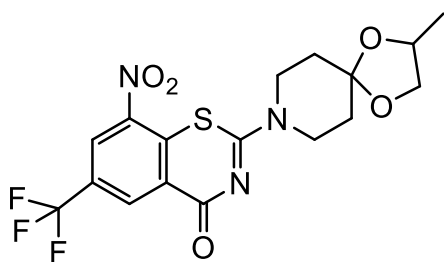


Obrázek 14 – Pretomanid

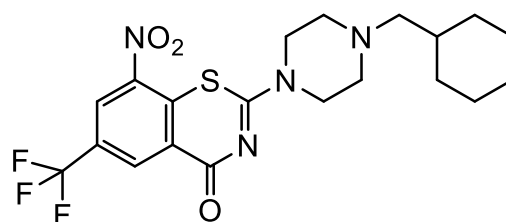
## 2.3.4. Léčiva ve II. a III. fázi klinických testů

### 2.3.4.1. Benzothiazinony

Jako další nadějná léčiva se začaly testovat látky ze skupiny benzothiazinonů. Jako první se objevila látka BTZ043 (Obrázek 15). Následně byl vyvinut PBTZ169, též známý pod názvem makozinon (Obrázek 16), který má oproti svému předchůdci několik výhod. Mezi ně se řadí nejen lepší farmakodynamika, ale také například jeho snazší syntéza díky absenci chirálních center a s tím spojené nižší náklady na výrobu. Obě tato léčiva ovšem vykazují dobrý synergický efekt proti TB v kombinaci s bedachilinem a klofamizinem. Jejich mechanismem účinku je kovalentní inhibice dekaprenylfosforyl-β-D-ribóza 2'-epimerázy (DprE1), který má klíčovou funkci při syntéze arabinózy nutné pro tvorbu buněčné stěny<sup>42,43</sup>.



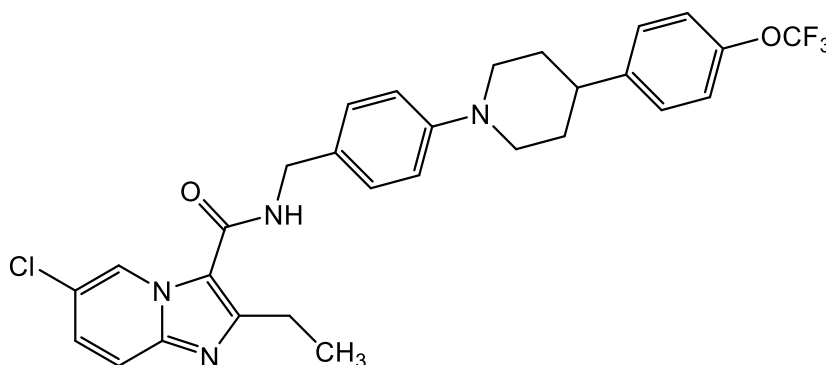
Obrázek 15 – BTZ043



Obrázek 16 – Makozinon

#### 2.3.4.2. Telacebek

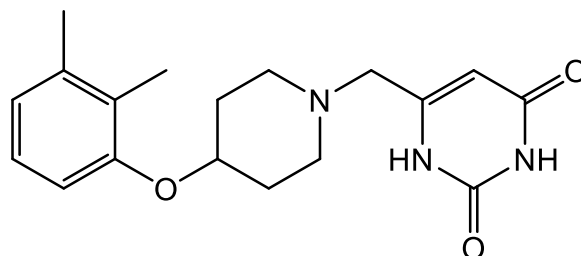
Telacebek, známý též jako Q203, (Obrázek 17) je imidazopyridinový derivát nacházející se aktuálně ve 2. fázi klinického testování. Je první ze skupiny léčiv s velmi specifickým účinkem na cytochromový bc1 komplex *M. tuberculosis*. Svým přímým inhibičním účinkem na tento komplex narušuje elektronový transportní řetězec a tím i schopnost bakterie produkovat energii<sup>44</sup>.



Obrázek 17 – Telacebek

#### 2.3.4.3. GSK286

GSK286 (Obrázek 18) je další unikátní léčivo které se aktuálně taktéž nachází ve 2. fázi klinického testování. Předpokládá se, že látka jako taková působí v bakterii na katabolismus cholesterolu. GSK286 působí i proti latentnímu stádium TB<sup>45</sup>.



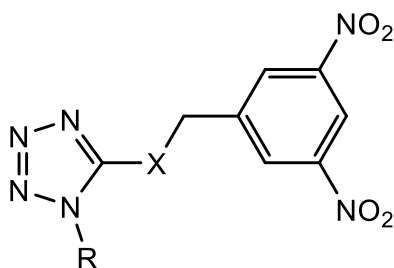
Obrázek 18 – GSK286

## 2.4. Dinitrofenyl substituované heterocykly a jejich reverzní deriváty

Na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy probíhá syntéza a studium potenciálních AT obsahujících ve své struktuře alespoň jednu nitroskupinu. Jako jedny z velmi úspěšných skupin látek zkoumaných na katedře s dobrou aktivitou a selektivitou, jak proti TB tak i proti jejím rezistentním kmenům, se staly 3,5-dinitrofenyl či 3,5-dinitrobenzyl tetrazoly a 1,3,4-oxadiazoly.

### 2.4.1. 1-substitované-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoly

Jedna z již zmíněných skupin, konkrétně 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoly (Obrázek 19), prokázala vysokou selektivní aktivitu proti *M. tuberculosis* a *M. kansasii*, a dále proti šesti MDR-TB kmenům. Zároveň vybrané sloučeniny vykazovaly minimální *in vitro* toxicitu (střední inhibiční koncentrace /IC<sub>50</sub>/ proti savčím buňkám > 30 μM)<sup>46</sup>.



Obrázek 19 – 1-substitované-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoly

V rámci této skupiny byly připraveny deriváty obsahující různé heteroatomy na místo atomu síry. Velmi podobně účinné byly bioisosterické látky, jak s atomem selenu, tak s atomem kyslíku. Heteroatom síry je však důležitým místem molekuly, na kterém se předpokládá, že dochází k první metabolizaci látky, a to jeho oxidací. Z toho důvodu byly v minulosti připraveny preparáty s částečně a úplně oxidovanou sírou u nichž se prokázalo, že se jejich účinek snížil, či zcela vymizel<sup>46</sup>.

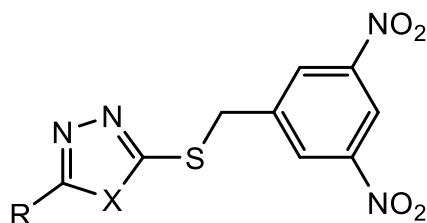
Další studie taktéž potvrdily, že dvě nitroskupiny navázané na benzylový zbytek jsou nutné pro silný antimykobakteriální efekt. Dalším důležitým faktorem je i poloha těchto nitroskupin: deriváty s nitroskupinami v polohách 3 a 5 prokazovaly výrazně vyšší aktivitu než jejich 2,4-analogy. Disubstituce v poloze 2,4 navíc prokazatelně zvýšila toxicitu molekul proti savčím buňkám a rozšířila spektrum účinku i proti některým kmenům bakterií a hub<sup>46</sup>.

Struktura tetrazolu je pro molekulu důležitá ale ne nezbytná, její výhodou je ovšem elektron odtahující efekt, který napomáhá antimykobakteriálnímu působení. Proto je velice důležitá i substituce v poloze 1, protože bez ní ve fyziologickém pH dochází k ionizaci

kyselého 1*H*-tetrazolu. Co se právě substituce v poloze 1 u tetrazolu týče, substituenty v této poloze mají vliv především na fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly. Ukázalo se také, že pokud je zbytkem substituovaný fenyl, nejvýhodnější je jeho substituce v poloze 4, analogy substituované v poloze 2 a 3 nevykazovaly tak dobrý účinek, což může souviset se sterickým bráněním substituentu<sup>46</sup>.

#### 2.4.2. 5-substituované-2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazoly

Podobné vlastnosti jako u 1*H*-tetrazolů se potvrdily i v sérii 1,3,4-oxadiazolových struktur (Obrázek 20). Byla zde opět prokázána potřeba 3,5-dinitrobenzylsulfanylové substituce, kdy i parciální redukce jedné nitroskupiny vedla až k úplnému vymizení účinku. A opět analogicky 3,5-dinitro substituce vykazovala lepší a selektivnější účinek než disubstituce v poloze 2,4<sup>47</sup>.



Obrázek 20 – 5-substituované-2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazoly

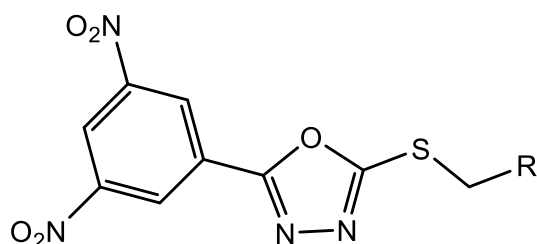
Většina derivátů této série prokázala výrazně vyšší aktivitu, než mají aktuální léčiva první linie, s hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) až 0,03  $\mu$ M. Některé deriváty vykazovaly vynikající výsledky proti MDR-TB kmenům a žádnou zkříženou rezistenci s AT první a druhé linie, navíc působily i na latentní formu, a to v nižších hodnotách MIC než rifampicin. Proti bakteriálním a fungálním kmenům pak neprokázaly 3,5 ani 2,4 deriváty žádný účinek, lze tedy s jistotou říci, že jsou specificky antimykobakteriální<sup>47</sup>.

Látky z této série rovněž vykazovaly minimální či žádnou toxicitu proti savčím buňkám. Žádná toxicita nebyla zjištěna ani proti lidským hepatocytům, a to dokonce ani v případě derivátů se třemi nitroskupinami. Bylo prakticky prokázáno, že 3,5-dinitrobenzylový zbytek v této sérii není genotoxický<sup>47</sup>.

Kromě redukce zde byl proveden pokus i o náhradu jedné nitroskupiny za skupinu trifluormethylovou, avšak deriváty s touto strukturální změnou se ukázaly jako neúčinné. Také alky/arylový substituent na pozici 2 u 1,3,4-oxadiazolu měl zanedbatelný efekt na antimikrobní aktivitu. Tento substituent nicméně opět určuje fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly, kde bylo prokázáno, že je výhodou spíše lipofilní substituent, jelikož deriváty s methylem nebo hydroxyfenylem prokázaly slabší aktivitu<sup>47</sup>.

### 2.4.3. *S*-substituované 5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thioly

Tato série „reverzních“ derivátů s převrácenou substitucí na oxadiazolovém heterocyklu (Obrázek 21) opět prokázala vynikající aktivitu jak na citlivé kmeny *M. tuberculosis*, tak i na rezistentní kmeny a i proti *M. kansasii*. Ukázalo, že 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazoly vykazují obdobnou mykobakteriální aktivitu jako původní předlohy 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazoly<sup>48</sup>.



Obrázek 21 – *S*-substituované-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thioly

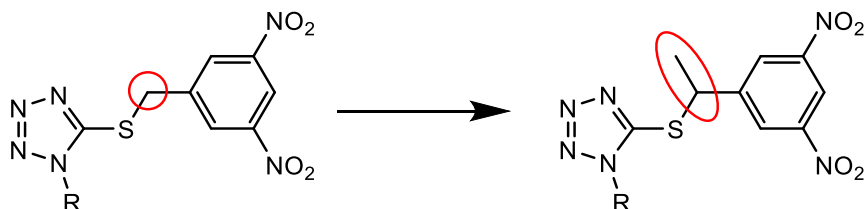
Strukturně se i zde potvrdila některá pravidla již známá z předchozích sérií. Například to, že lipofilní zbytek navázaný přes methylsulfanylový můstek zlepšuje účinek, a naopak že substituce více hydrofilními zbytky způsobuje až úplné vytracení efektu. Náhraza jedné z nitroskupiny za amino, hydroxy, acetyl a aminoacetyl skupinu způsobily úplné vymizení účinku. Avšak překvapivě trifluormethylová náhrada jedné nitroskupiny dala vzniknout sérii, která sice oproti dinitro analogům nevykazovala tak příznivé hodnoty MIC, ale přes to si ponechala vynikající antimykobakteriální účinek. To pravděpodobně prokazuje fakt, že silný elektron odtahující substituent může fungovat jako náhrada jedné nitroskupiny. Navíc tyto 1,3,4-oxadiazoly vykazaly zanedbatelný či žádný efekt na savčí buňky s  $IC_{50}$  i nad  $1000 \mu\text{M}$ . Proti dalším bakteriálním či fungálním kmenům se ukázaly naprosto bez efektu, což značí, že antimykobakteriální účinek těchto struktur byl opět velmi selektivní<sup>48</sup>.

### 3. CÍL PRÁCE

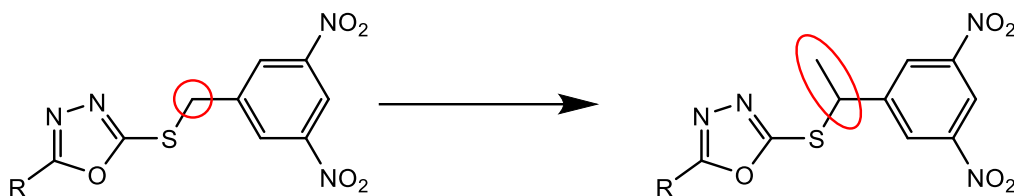
Cílem této práce bylo rozšířit znalosti o vztazích mezi strukturou a účinkem u antimykobakteriálně aktivních 3,5-dinitrobenzylsulfanyl 1*H*-tetrazolů a 1,3,4-oxadiazolů a v neposlední řadě i u reverzních 3,5-dinitrofenyl 1,3,4-oxadiazolů.

V první části této práce jsme se zaměřili na přípravu analogů předlokových látek se sterickým stíněním atomu síry v molekule methylovou skupinou a vlivem této modifikace na antimykobakteriální účinnost, případně na metabolickou stabilitu výsledných sloučenin.

Byly připraveny dvě série finálních látek, a to I. série – tetrazolová (Obrázek 22) a II. série – oxadiazolová (Obrázek 23), obě zahrnující čtyři sloučeniny, u kterých byla hodnocena jejich antimykobakteriální aktivita a výsledky porovnávány s jejich předlohovými sloučeninami.

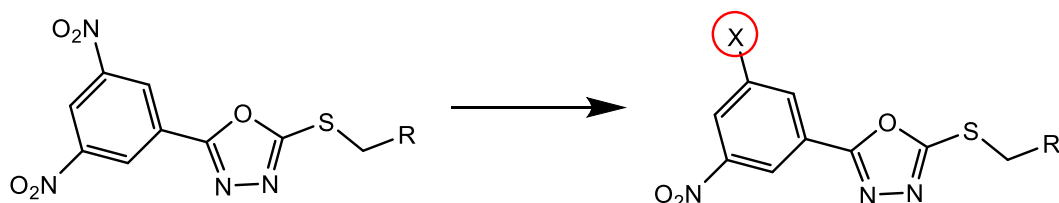


Obrázek 22 – 1*H*-tetrazolová analoga s přidáním methylové skupiny pro sterické stínění atomu síry v I. sérii



Obrázek 23 – 1,3,4-oxadiazolová analoga s přidáním methylové skupiny pro sterické stínění atomu síry v II. sérii

V druhé části práce byl studován vliv záměny jedné nitroskupiny za halogenovou skupinu u tzv. reverzních analogů na antimykobakteriální aktivitu. Byla připravena III. série – reverzní analoga oxadiazolů (Obrázek 24), v nichž byla provedena záměna jedné nitroskupiny za atom bromu nebo chloru.



Obrázek 24 – Reverzní analoga 1,3,4-oxadiazolů se záměnou jedné nitroskupiny za skupinu halogenovou v III. sérii



## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Přístroje a chemikálie

Pro syntézu všech látek popsaných v této práci byly využity komerčně dostupné chemické látky a rozpouštědla, které byly použity do reakcí bez další purifikace, případně byly využity dříve připravené sloučeniny na Katedře organické a bioorganické chemie.

Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), konkrétně na TLC deskách Merck silica gel 60 F254. Mobilní fáze byly zvoleny dle typu reakce a jejich složení je uvedeno v postupech jednotlivých syntéz. Detekce na TLC deskách byla provedena pod UV lampou se zářením o vlnové délce 254 nm.

Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byl využit Merck Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm).

Čistota jednotlivých syntetizovaných látek byla ověřena za využití nukleární magnetické rezonance (NMR)  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spektrometrie. Spektra byla změřena na spektrometru VNMR S500 NMR, případně na spektrometru JNM-ECZ 600R. Hodnoty chemického posunu  $\delta$  [ppm] v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech jsou nepřímo vztaženy k vnitřnímu standardu tetramethylsilanu. Elementární analýza jednotlivých látek se měřila na přístroji Automatic Microanalyser EA1110CE. Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku.

Názvy všech sloučenin byly získány v programu ChemDraw 19.1 a následně byly podle pravidel přeloženy do českého jazyka a upraveny. V tomtéž programu byly získány chemické vzorce, reakční schémata a vybrané analytické údaje (hodnoty teoretické elementární analýzy, molekulové hmotnosti).

### 4.2. Tetrazolová série (I. série)

A. V první reakci byl z 3,5-dinitroacetofenonu (1 ekvivalent /eq/, 2 g, 9,52 mmol) redukcí pomocí 1M  $\text{BH}_3$  v tetrahydrofuranu (THF) (2 eq, 19 ml, 19 mmol), vše rozpuštěno v THF (80 ml), připraven příslušný 1-(3,5-dinitrofenyl)ethanol. Reakce byla provedena pod inertní atmosférou argonu. Po rozpuštění ketonu v THF byla reakce ochlazena na teplotu  $-30\text{ }^\circ\text{C}$ , poté bylo přes septum injekcí pomalu přikapáno  $\text{BH}_3$ . Po 1 hodině bylo chlazení přerušeno a reakce byla míchána při pokojové teplotě přibližně 16 hodin. Po kontrole provedené pomocí TLC byla následně reakce ukončena přidávkem 2 ml koncentrované kyseliny octové. Následovalo odpaření reakční směsi na rotační odparce za sníženého tlaku a znovu rozpuštění v ethyl-acetátu (EtOAc) (40 ml). Směs byla následně protřepána  $2 \times 40$  ml nasyc. roztokem  $\text{NaHCO}_3$  a  $1 \times 30$  ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Organická fáze EtOAc byla vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena (před odpařením bylo provedeno kontrolní TLC). Produkt byl izolován a přečištěn za pomoci sloupcové

chromatografie s mobilní fází (He:EtOAc, 4:1). Tato reakce byla provedena celkem 2krát z důvodu doplnění alkoholu pro další reakce.

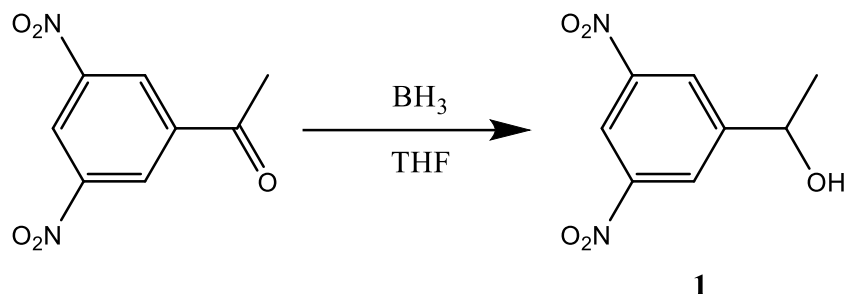


Schéma 1 – Redukce výchozího ketonu na alkohol **1**

**1: 1-(3,5-dinitrofenyl)ethanol (1)**

Vzhled:	běžová krystalická látka
Molární hmotnost:	212,16 g/mol
Teoretický výtěžek:	2,019 g; 2,105 g
Praktický výtěžek:	1,632 g (81 %) 1,507 g (72 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,94 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,60 (dd, <i>J</i> = 2,1, 0,7 Hz, 2H), 5,21 – 5,11 (m, 1H), 2,33 (d, <i>J</i> = 3,7 Hz, 1H), 1,62 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 150,33, 148,58, 125,75, 117,61, 68,68, 25,63
Teoretická elementární analýza (EA):	C – 45,29; H – 3,80; N – 13,20
Naměřená EA:	C – 45,23; H – 3,42; N – 13,65
Teplota tání:	74–76 °C (lit <sup>49</sup> 92–94 °C)

B. Jako další byl z připraveného alkoholu **1** (1 eq, 0,505 g, 2,38 mmol) rozpuštěného v CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 ml) pod inertní atmosférou připraven jeho mesylát **2**. Reakční směs byla míchána pod inertní atmosférou za chlazení pomocí ledové lázně. Přes septum byla injekcí postupně přikapána činidla methylsulfonychlorid MeSO<sub>2</sub>Cl (1,3 eq, 0,273 g, 3,09 mmol) a následně triethylamin (TEA) (2 eq, 0,480 g, 4,76 mmol). Reakce byla ponechána při pokojové teplotě 1 h za stálého míchání a následně po provedení TLC byla reakční směs protřepána 2 × nasyc. roztokem NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) a 1 × H<sub>2</sub>O (30 ml). Po vytřepání byl produkt vysušen bezvodým síranem sodným, přefiltrován přes vat a po kontrole TLC nevykazující znečištění bylo rozpouštědlo odpařeno a surový mesylát **2** byl použit pro další reakce. Tato reakce byla pro potřebu dalšího produktu provedena celkem třikrát.

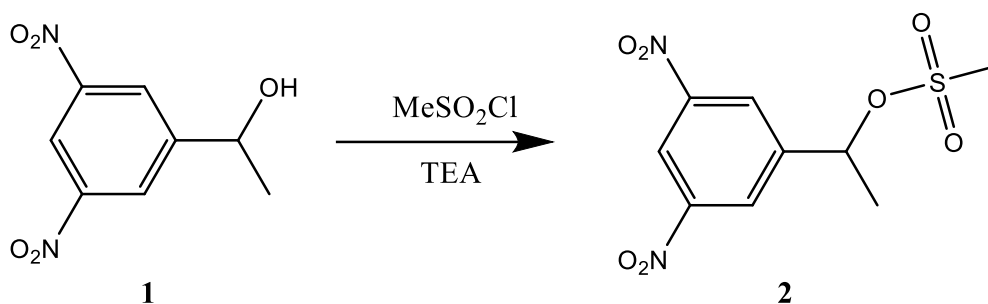


Schéma 2 – Mesylace alkoholu 1

**2: 1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl-mesylát (2)**

Vzhled:	běžovo-bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	290,25 g/mol
Teoretický výtěžek:	0,691 g, 0,410 g, 1,053 g
Praktický výtěžek:	0,573 g (83 %), 0,321 g (78 %), 0,915 g (87 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 9,05 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,60 (dd, <i>J</i> = 2,0, 0,6 Hz, 2H), 5,95 (q, <i>J</i> = 6,6 Hz, 1H), 3,10 (s, 3H), 1,82 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H).
Teoretická EA:	C – 39,93; H – 3,47; N – 9,65; s – 11,05
Naměřená EA:	C – 37,08; H – 3,30; N – 9,74; s – 10,56
Teplota tání:	166-168 °C

C. Pro finální čtyři reakce byl připravený mesylát **2** (1 eq) vždy rozpuštěn v acetonitrilu (5-6 ml) společně s příslušným 1-substituovaným 1*H*-tetrazol-5-thiolem (1,2 eq, u brom a methoxy derivátu 1,4 eq). Po rozpuštění byl přidán TEA (opět 1,2 eq a v případě brom a methoxy derivátu 1,4 eq). Reakční směsi byly poté zahřívány na 50 °C a po ověření TLC byly po 1 hodině zpracovány. Acetonitril byl odpařen na vakuové odparce a produkt rozpuštěn v EtOAc (25 ml), následně 2 × protřepán s 25 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> a 1 × 25 ml H<sub>2</sub>O. Organická vrstva byla oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným a poté za sníženého tlaku odpařena. Všechny produkty byly z důvodu přítomnosti nečistot a stopového množství výchozího mesylátu následně purifikovány sloupcovou chromatografií s využitím silikagelu jako stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla zvolena směs hexan:ethyl-acetát v poměru 3:1.

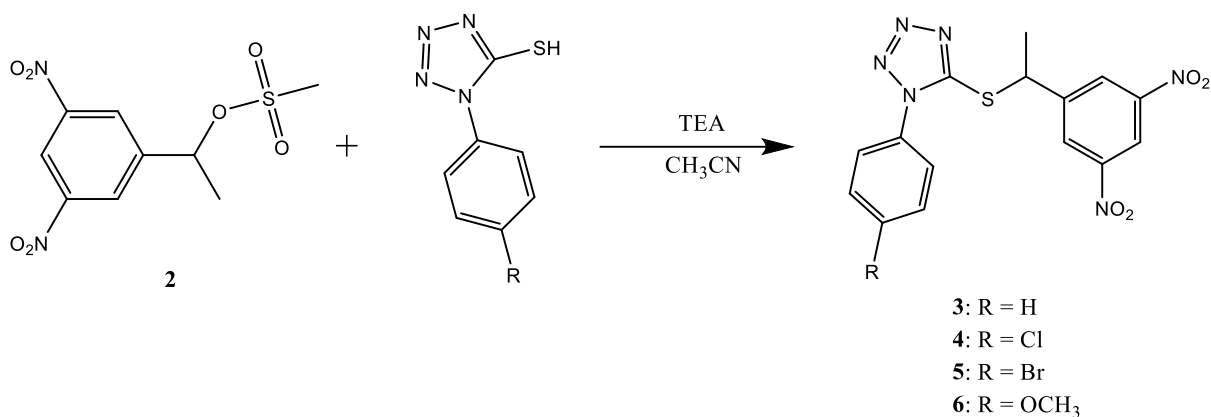


Schéma 3 – Příprava finálních 1H-tetrazolů 3-6

**3: 5-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-1-fenyl-1H-tetrazol (3)**

Vzhled:	bílá/běžovo-bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	372,36 g/mol
Teoretický výtěžek:	128,24 mg
Praktický výtěžek:	115,6 mg (93 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,92 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,69 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2H), 7,59 – 7,52 (m, 3H), 7,50 – 7,45 (m, 2H), 5,35 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 1,90 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
Teoretická EA:	C – 48,38; H – 3,25; N – 22,57; s – 8,61
Naměřená EA:	C – 49,13; H – 3,24; N – 22,28; s – 8,72
Teplota tání:	164-166 °C

**4: 1-(4-chlorfenyl)-5-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-1H-tetrazol (4)**

Vzhled:	žlutá krystalická látka
Molární hmotnost:	406,80 g/mol
Teoretický výtěžek:	135 mg
Praktický výtěžek:	96 mg (71 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,94 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,70 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,54 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,45 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 5,36 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 1,91 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
Teoretická EA:	C – 44,24; H – 2,73; N – 20,66; s – 7,88
Naměřená EA:	C – 44,71; H – 2,86; N – 20,39; s – 7,98
Teplota tání:	168-170 °C

**5: 1-(4-bromfenyl)-5-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-1H-tetrazol (5)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	451,26 g/mol

Teoretický výtěžek:	163 mg
Praktický výtěžek:	130 mg (79 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,94 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,70 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,70 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 5,36 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 1,91 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 152,15, 148,74, 146,44, 133,36, 132,22, 127,96, 127,90, 125,22, 118,54, 46,03, 22,09
Teoretická EA:	C – 39,93; H – 2,46; N – 18,62; s – 7,10
Naměřená EA:	C – 39,97; H – 2,21; N – 18,74; s – 7,24
Teplota tání:	172-174 °C

#### 6: 5-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-1-(4-methoxyfenyl)-1*H*-tetrazol (6)

Vzhled:	žluto-oranžová krystalická látka
Molární hmotnost:	402,39 g/mol
Teoretický výtěžek:	139 mg
Praktický výtěžek:	93 mg (67 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,95 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,70 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 2H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 7,05 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 5,38 – 5,30 (m, 1H), 3,90 (s, 3H), 1,91 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 161,06, 152,13, 148,60, 146,62, 127,80, 125,72, 125,48, 118,33, 115,03, 55,71, 45,71, 22,02
Teoretická EA:	C – 47,76; H – 3,51; N – 20,89; s – 7,97
Naměřená EA:	C – 46,86; H – 3,79; N – 19,90; s – 7,60
Teplota tání:	60-62 °C

### 4.3. Oxadiazolá série (II. série)

D. V této sérii se jednalo celkem o 4 reakce kdy jako výchozí látka byl použit již výše zmiňovaný 1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl-mesylát. (2). Pro přípravu produktů **7**, **8** a **9** bylo využito 100 mg mesylátu **2** (1 eq, 0,34 mmol), pro syntézu látky **10** (1 eq, 0,37 mmol) to bylo 108 mg. Jako další byly přidány na katedře již připravené 5-substituované-1,3,4-oxadiazol-2-thioly (*Schéma 4*) v množstvích 80 mg pro přípravu látky **7** (1,3 eq, 95 mg, 0,45 mmol) pro přípravu látky **8**, (1,3 eq, 86 mg, 0,45 mmol) pro přípravu látky **9** (1,3 eq, 80 mg, 0,45 mmol) a pro přípravu látky **10** to bylo (1,3 eq, 100 mg, 0,48 mmol) daného oxadiazolu (tedy ve všech reakcích 1,3 eq). Po rozpuštění výchozích látek v 3 ml acetonitrilu byl přidán 1 eq triethylaminu (0,06 ml pro reakce 7-

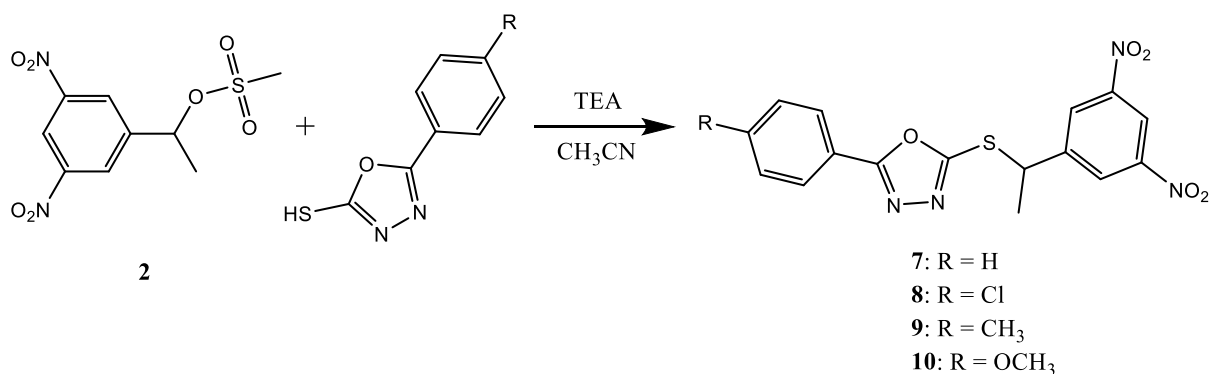
**9**; 0,066 ml pro reakci **10**, tedy 1,3 eq). Následovalo míchání reakčních směsí, kontrola pomocí TLC a jejich přečištění, rozdíly u jednotlivých reakcí budou popsány níže:

**Produkt 7:** Mícháno za laboratorní teploty po dobu 12 hodin. Po skončení reakce provedena filtrace, krystaly byly promyty vodou a vysušeny.

**Produkt 8:** Mícháno 48 hodin za laboratorní teploty, po skončení byla reakční směs odpařena za sníženého tlaku a rozpuštěna v EtOAc (30 ml). Tato organická fáze byla poté 3krát proextrahována nasyceným NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) a jednou H<sub>2</sub>O (30 ml). Organická vrstva byla po extrakci oddělena, vysušena a odpařena na odparce. Takto vzniklý produkt byl poté přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s využitím silikagelu jako stacionární fáze a chloroformu jako fáze mobilní.

**Produkt 9:** Reakční směs byla míchána 24 hodin za pokojové teploty, po skončení byla na 24 hodin daná do lednice a poté byly ve směsi vzniklé krystaly odfiltrovány na Büchnerově nálevce, promyty vodou a vysušeny.

**Produkt 10:** Zde probíhala reakce stejně jako v případě **8**, pouze s tím rozdílem, že směs byla míchána pouze 24 hodin.



*Schéma 4 – Finální příprava 1,3,4 oxadiazolů 7-10*

**7: 2-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-5-fenyl-1,3,4-oxadiazol (7)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	374,37 g/mol
Teoretický výtěžek:	129 mg
Praktický výtěžek:	75 mg (58 %)
<sup>1</sup> H NMR	<sup>1</sup> H NMR (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,93 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,72 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,93 – 7,90 (m, 2H), 7,53 – 7,49 (m, 1H), 7,48 – 7,44 (m, 2H), 5,19 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 1,92 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H).
<sup>13</sup> C NMR	<sup>13</sup> C NMR (151 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 166,25, 161,75, 148,71, 146,85, 132,10, 129,21, 127,88, 126,79, 123,23, 118,45, 45,22, 22,00.

**8: 2-(4-chlorfenyl)-5-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (8)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	406,80 g/mol
Teoretický výtěžek:	140 mg
Praktický výtěžek:	40 mg (29 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,95 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,74 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,88 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,47 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 5,22 (q, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 1,94 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 165,29, 161,95, 148,58, 146,60, 138,30, 129,51, 127,92, 127,75, 121,57, 118,36, 45,12, 21,87

**9: 2-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-5-(*p*-tolyl)-1,3,4-oxadiazol (9)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	368,38 g/mol
Teoretický výtěžek:	127 mg
Praktický výtěžek:	60 mg (47 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,95 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,74 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,82 (d, <i>J</i> = 8,2 Hz, 2H), 7,39 – 7,12 (m, 2H), 5,20 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 2,41 (s, 3H), 1,93 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	NMR (126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 166,28, 161,20, 148,56, 146,78, 142,62, 129,79, 127,76, 126,62, 120,32, 118,30, 45,08, 21,88, 21,61

**10: 2-((1-(3,5-dinitrofenyl)ethyl)thio)-5-(4-methoxyfenyl)-1,3,4-oxadiazol (10)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	402,38 g/mol
Teoretický výtěžek:	150 mg
Praktický výtěžek:	80 mg (53 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 8,95 (t, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 8,73 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 2H), 7,87 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 6,97 (d, <i>J</i> = 8,9 Hz, 2H), 5,18 (q, <i>J</i> = 7,3 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H), 1,92 (d, <i>J</i> = 7,3 Hz, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 166,10, 162,50, 160,80, 148,56, 146,82, 128,47, 127,75, 118,28, 115,56, 114,52, 55,44, 45,09, 21,86

#### 4.4. Reverzní analoga oxadiazolů (III. série)

A. Výchozí látkou pro tuto sérii byla kyselina 3-nitrobenzoová (1 eq, 4 g, 23,93 mmol) ze které bylo za pomoci *N*-bromsukcinimidu (NBS) (1,2 eq, 5,1 g, 28,65 mmol) v prostředí kyseliny sírové (15 ml, 96 %) připravena kyselina 3-brom-5-nitrobenzoová (**11**). Výchozí látka byla za stálého míchání rozpuštěna v koncentrované kyselině sírové a následně bylo přidáno 3krát po 15minutových intervalech 1,7 g NBS (tedy 5,1 g celkem). Od posledního přidání NBS byla reakční směs zahřívána na 70 °C a míchána po dobu 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs prolita 50 ml ledové H<sub>2</sub>O a odfiltrována za sníženého tlaku. Finální produkt byl kontrolován pomocí TLC, které sice vykazovalo malé známky nečistot, ale i tak byl produkt dostatečně čistý pro další reakci.

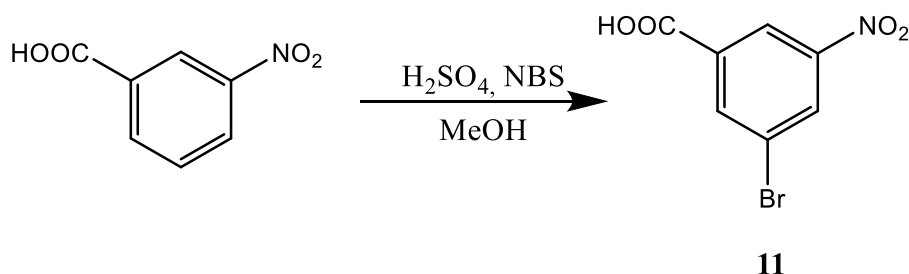


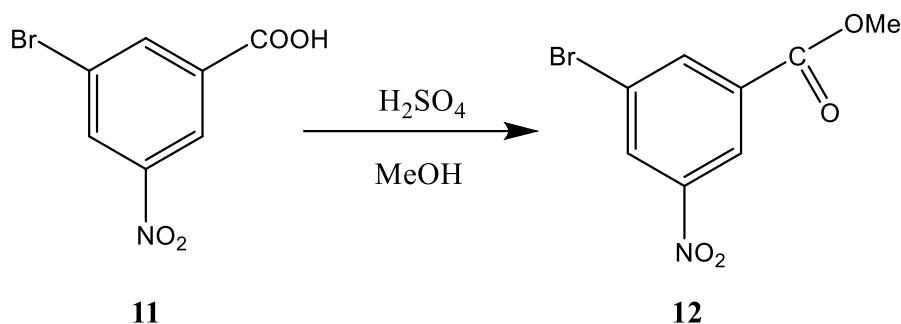
Schéma 5 – Příprava 3-brom-5-nitrobenzoové kyseliny **11**

##### **11: 3-brom-5-nitrobenzoová kyselina (11)**

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	246,02 g/mol
Teoretický výtěžek:	5,89 g
Praktický výtěžek:	5,80 g (98 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,58 (t, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H), 8,52 – 8,50 (m, 1H), 8,37 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 164,88, 149,25, 138,17, 134,69, 130,49, 123,33, 122,93
Teoretická EA:	C – 34,18; H – 1,64; N – 5,69
Naměřená EA:	C – 33,78; H – 1,43; N – 5,53
Teplota tání:	160-162 °C (lit. <sup>50</sup> 160,5-161,5 °C)

B. Kyselina **11** (5,8 g, 23,55 mmol) byla následně rozpuštěna v methanolu (65 ml) a esterifikována za katalýzy kyselinou sírovou (0,15 ml, 96 %). Reakce byla míchána za varu methanolu po dobu 5 hodin. Poté byl methanol odpařen za sníženého tlaku. K odparku byl přidán 5 % NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) a pevný podíl byl odfiltrován na Büchnerově nálevce. Vodný filtrát byl protřepán v 2 × 20 ml hexanu. Ten byl poté přidán k pevnému produktu a odpařen na odparce.





*Schéma 6 – Příprava methylesteru 12*

### 12: Methylester kyseliny 3-brom-5-nitrobenzoové (12)

Vzhled:	šedobílá krystalická látka
Molární hmotnost:	260,04 g/mol
Teoretický výtěžek:	6,124 g
Praktický výtěžek:	3,610 g (59 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,65 (t, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H), 8,55 (dd, <i>J</i> = 2,1, 1,4 Hz, 1H), 8,44 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 163,61, 148,90, 137,66, 132,95, 130,56, 122,88, 122,73, 53,34,
Teoretická EA:	C – 36,95; H – 2,33; N – 5,39
Naměřená EA:	C – 36,44; H – 1,96; N – 5,24
Teplota tání:	66-68 °C (lit. <sup>51</sup> 71-74 °C)

C. Methylester kyseliny 3-brom-5-nitrobenzoové (**12**) (1 eq, 3,575 g, 13,74 mmol) byl následně rozpuštěn v methanolu (45 ml) a za přítomnosti hydrazinu (3 eq, 1,32 g 41,24 mmol) byl převeden na 3-brom-5-nitrobenzohydrazid (**13**). Po rozpuštění výchozí látky v methanolu bylo přidán hydrazin a reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin za teploty 65 °C a následně dalších 15 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs zahuštěna na vakuové odparce a zbytek vyliť do ledové H<sub>2</sub>O (50 ml). Pevný podíl byl odfiltrován na Büchnerově nálevce a filtrát byl extrahován v 2 × 30 ml EtOAc. Následně byla organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným, spojena s pevným produktem z filtru a odpařena na odparce.

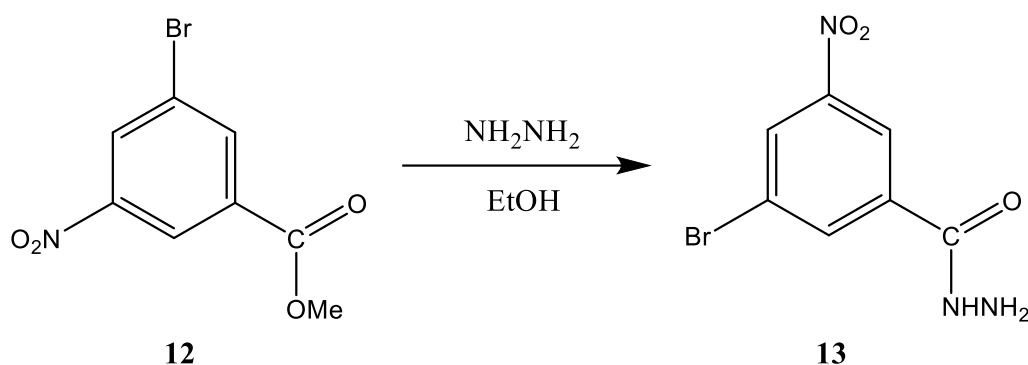
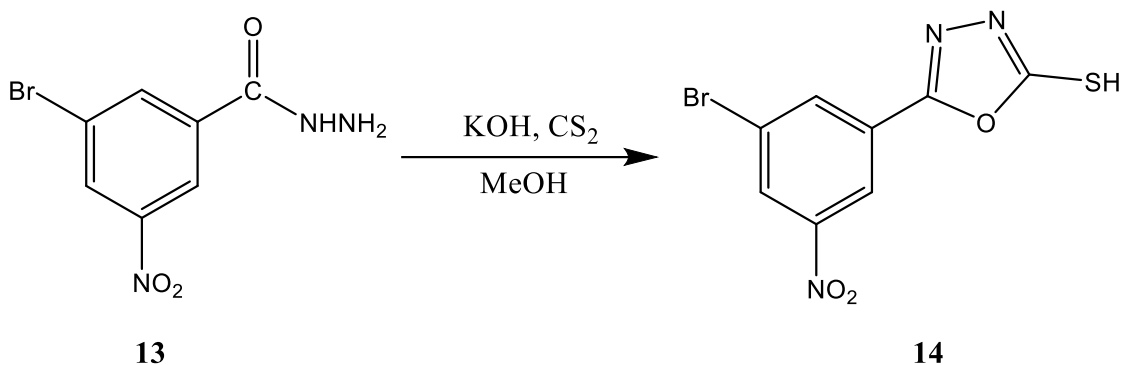


Schéma 7 – Příprava benzohydrazidu 13

### 13: 3-brom-5-nitrobenzohydrazid

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	260,05 g/mol
Teoretický výtěžek:	3,575 g
Praktický výtěžek:	2,790 g (78 %)
<sup>1</sup> H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10,25 (s, 1H), 8,62 (t, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 8,53 (t, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H), 8,43 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H), 4,67 (s, 2H)
<sup>13</sup> C NMR	(126 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 162,52, 149,09, 136,63, 136,13, 128,82, 122,67, 121,51
Teoretická EA:	C – 32,33; H – 2,33; N – 16,16
Naměřená EA:	C – 32,54; H – 2,22; N – 15,91
Teplota tání:	180-182 °C

D. Benzohydrazid **13** (1 eq, 2,725 g 10,48 mmol) byl rozpuštěn ve směsi 65 ml EtOH s 0,97 mg 85 % KOH (1 eq, 0,83 mg čistého KOH 10,48 mmol). Do směsi byl následně přidán 2,67 ml CS<sub>2</sub> (4 eq, 41,92 mmol). Směs byla za stálého míchání zahřívána na 70 °C po dobu 6 hodin a poté při pokojové teplotě dalších 12 hodin. Ethanol byl z reakce odpařen a do baňky bylo přilito 100 ml H<sub>2</sub>O a přikapáno HCl do mírného okyselení směsi (pH = 3-4). Tato vodná fáze byla extrahována 3 × 150 ml EtOAc a po odpaření byl vzorek změřen na NMR, protože TLC se jevílo jako čisté. NMR ovšem ukázalo znečištění produktu. Po vyzkoušení určitých mobilních fází se ukázalo, že nad skvrnou produktu je na TCL stín. Přestože finální látka nebyla zcela čistá, byla použita další reakce.



*Schéma 8 – Příprava 1,3,4 oxadiazol-2-thiolu 14*

**14: 5-(3-brom-5-nitro)-1,3,4-oxadiazol-2-thiol (14)**

Vzhled:	běžová krystalická látka
Molární hmotnost:	302,10 g/mol
Teoretický výtěžek:	3,165 g
Praktický výtěžek:	2,365 g (75 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 11,39 (s,1H), 8,56 (t, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H), 8,45 – 8,41 (m, 1H), 8,36 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 178,27, 158,27, 149,49, 134,75, 129,57, 126,18, 123,66, 120,30

E. Z připraveného thiolu **14** byly poté stejným postupem připraveny 4 finální produkty. Jednalo se o rozpuštění thiolu **14** (1 eq) v acetonitrilu (16-20 ml), do kterého se poté přidal 1 eq daného benzylbromidu nebo benzylchloridu jako alkylačního činidla následně bylo přidáno 1,2 ekvivalentu TEA jako baze. Reakční směsi byly poté míchány při teplotě 75 °C po dobu 4-6 hodin. Následně byly směsi zbaveny acetonitrilu pomocí vakuové odparky a po rozpuštění v EtOAc (25 ml) byly protřepány s nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (2 × 20 ml) a s H<sub>2</sub>O (1 × 20 ml). Následně byly vysušeny síranem sodným a odpařeny. Další čištění finálních produktů bylo jednotné pouze pro látky **15**, **16** a **18** a proběhlo přidáním malého objemu etheru do produktu (10-15 ml) ve kterém se látky po zahřátí pod refluxem a intenzivním mícháním rozpustily. Část etheru se nechala odpařit při chladnutí a baňky byly poté ochlazeny vodou s ledem. Tím došlo ke krystalizaci finálních produktů a následně byly odfiltrovány na Büchnerově nálevce a zbaveny zbytku etheru sušením. Methoxyderivát **17** se ukázal tímto způsobem nevyčistitelný, protože se i malém množství etheru úplně rozpouštěl. Avšak jako ideální se ukázal směs hexan:ethyl-acetát 3:1, jelikož se v ní rozpustily všechny nečistoty a filtrací byla získána čistá látka.

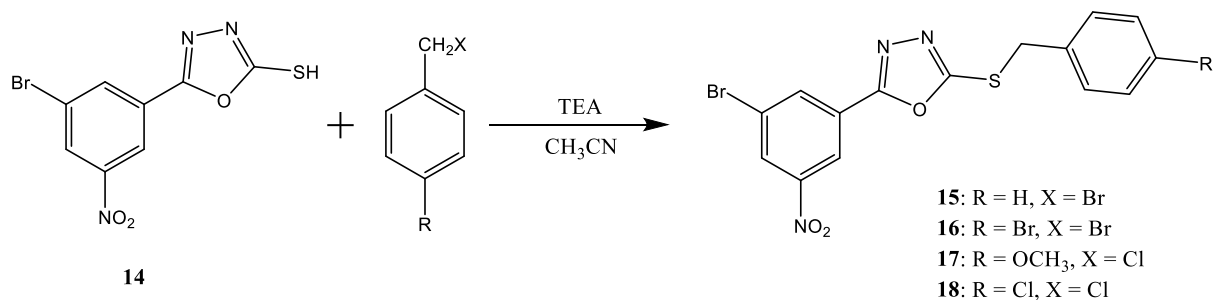


Schéma 9 – Příprava finálních 1,3,4-oxadiazolů 15-18

**15: 2-(benzylthio)-5-(3-brom-5-nitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (15)**

Vzhled:	nažloutlá krystalická látka
Molární hmotnost:	392,23 g/mol
Teoretický výtěžek:	285 mg
Praktický výtěžek:	92 mg (32 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,57 (t, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H), 8,55 (dd, <i>J</i> = 2,1, 1,4 Hz, 1H), 8,47 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H), 7,50 – 7,43 (m, 2H), 7,35 – 7,30 (m, 2H), 7,29 – 7,24 (m, 1H), 4,60 (s, 2H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 165,35, 163,30, 149,56, 137,05, 135,12, 129,65, 129,46, 129,15, 128,39, 126,57, 123,67, 120,61, 36,44
Teplota tání:	108-110 °C

**16: 2-(3-brom-5-nitrofenyl)-5-((4-brombenzyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (16)**

Vzhled:	běžová krystalická látka
Molární hmotnost:	471,12 g/mol
Teoretický výtěžek:	343 mg
Praktický výtěžek:	75 mg (22 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,57 (t, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H), 8,56 – 8,54 (m, 1H), 8,47 (t, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 7,51 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H), 7,43 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H), 4,57 (s, 2H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 165,17, 163,39, 149,56, 136,82, 135,15, 132,03, 131,87, 129,48, 126,57, 123,66, 121,55, 120,65, 35,66
Teplota tání:	132-134 °C

**17: 2-(3-brom-5-nitrofenyl)-5-((4-methoxybenzyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (17)**

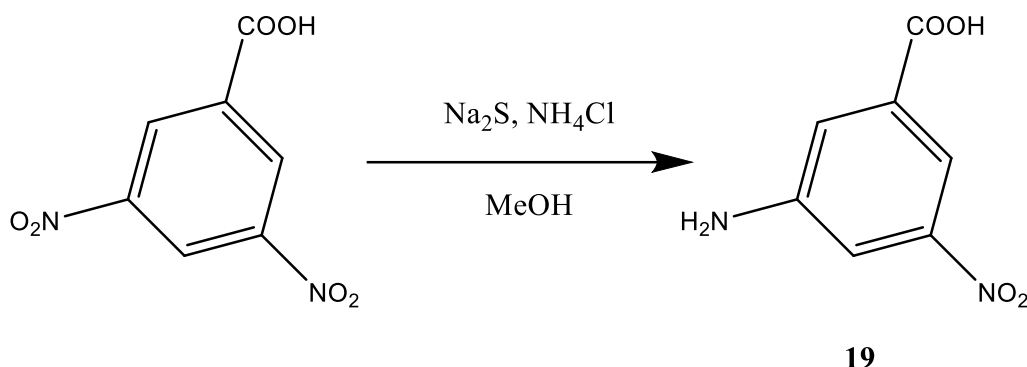
Vzhled:	světle žlutá krystalická látka
Molární hmotnost:	421,27 g/mol
Teoretický výtěžek:	418 mg

Praktický výtěžek:	121 mg (29 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,57 – 8,54 (m, 2H), 8,47 (t, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 6,87 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 4,54 (s, 2H), 3,69 (s, 3H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 165,45, 163,24, 159,46, 149,54, 135,10, 130,98, 129,43, 128,65, 126,58, 123,68, 120,59, 114,54, 55,64, 36,19
Teplota tání:	122-124 °C

**18: 2-(3-brom-5-nitrofenyl)-5-((4-chlorbenzyl)thio)-1,3,4-oxadiazol (18)**

Vzhled:	běžová krystalická látka
Molární hmotnost:	426,67 g/mol
Teoretický výtěžek:	353 mg
Praktický výtěžek:	175 mg (49 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 8,58 – 8,54 (m, 2H), 8,47 (t, <i>J</i> = 1,7 Hz, 1H), 7,49 (d, <i>J</i> = 8,5 Hz, 2H), 7,38 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H), 4,58 (s, 2H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 165,18, 163,38, 149,56, 136,38, 135,14, 133,01, 131,54, 129,47, 129,09, 126,57, 123,66, 120,64, 35,61
Teplota tání:	116-118 °C

F. Jako poslední byla započata syntéza derivátu obsahující místo jedné nitroskupiny chlor. Výchozí látkou byla v tomto případě kyselina 3,5-dinitrobenzoová (1 eq, 1 g, 4,71 mmol), která byla po rozpuštění v MeOH (30 ml) a za pomoci 60% Na<sub>2</sub>S (4 eq, 2,45 g, 18,85 mmol) a NH<sub>4</sub>Cl (10 eq, 2,52 g, 47,14 mmol) parciálně redukována na kyselinu 3-amino-5-nitrobenzoovou (**19**). Činidla byla smíchána s methanolem, pak byla přidána 3,5-dinitrobenzoová kyselina, která se nechala míchat za varu rozpouštědla po dobu 17 hodin. Následně byla směs ochlazená na pokojovou teplotu, přefiltrována za sníženého tlaku a zbytek na filtru byl propláchnut methanolem. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce. Odparek byl poté smíchán s 60 ml H<sub>2</sub>O, ponechán 15 minut míchat a pak odfiltrován. Tak bylo získáno 45 mg, tedy pouze 6 % produktu. Vodná fáze byla poté extrahována 6 × 30 ml EtOAc a na poslední čtyři extrakce byly přidány ještě 2 kapky HCl. EtOAc byl poté vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen. Takto bylo získáno 735 mg, tedy 94 % produktu. Do další reakce byl produkt z důvodu dostatečné kvality použit bez dalšího čištění.

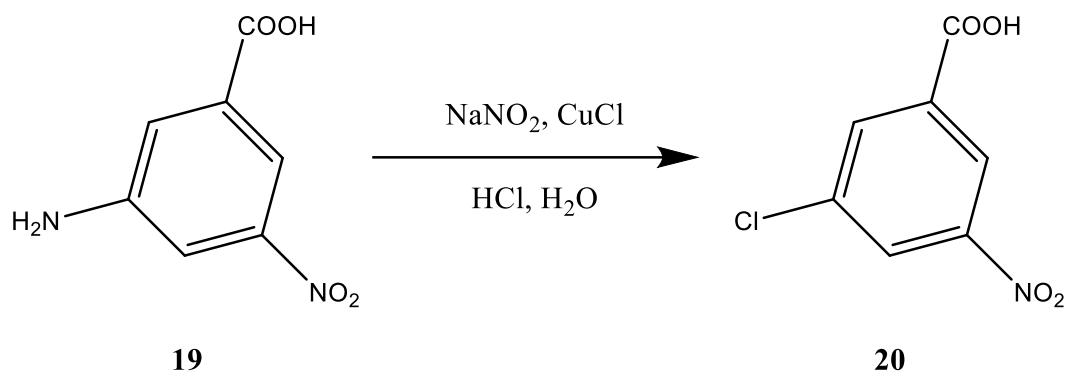


*Schéma 10 – Příprava 3-amino-5-nitrobenzoové kyseliny **19** kyseliny*

**19: 3-amino-5-nitrobenzoová kyselina (19)**

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	182,14 g/mol
Teoretický výtěžek:	858 mg
Praktický výtěžek:	780 mg (91 %)
Teplota tání:	205-207 °C

G. Po provedení parciální redukce byl produkt (2 g – 0,788 g produktu **19** + 1,246 g produktu připraveného na katedře, 1 eq, 10,98 mmol) rozpuštěn v koncentrované kyselině chlorovodíkové (140 ml) a za stálého míchání ochlazen na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byl do směsi během hodiny a půl postupně přikapán roztok  $\text{NaNO}_2$  (7 eq, 5,3 g, 76,86 mmol) rozpuštěný v 80 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Po přidání dusitanu sodného byla do reakční směsi během další hodiny přidána po kapkách suspenze  $\text{CuCl}$  (9 eq, 9,73 g, 98,83 mmol) v 80 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Po celou dobu byla kontrolována teplota směsi tak, aby nepřevýšila  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po přidání obou činidel byla reakční směs míchána při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a pak byla na 30 minut zahřívána na  $60\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byla směs ochlazená, extrahována  $3 \times 80\text{ ml EtOAc}$ , organická vrstva byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odpařena za sníženého tlaku. Produkt byl poté přečištěn sloupcovou chromatografií nejdříve s mobilní fází hexan:EtOAc:kyselina octová v poměru 30:10:1 a následně z důvodu setrvávání nečistot ještě jednou ve stejných fázích v poměrech 20:10:1. I přes obě sloupcové chromatografie nebyl finální produkt sice zcela čistý, ale byl dostatečně čistý na to, aby s ním byla zahájena další reakce.

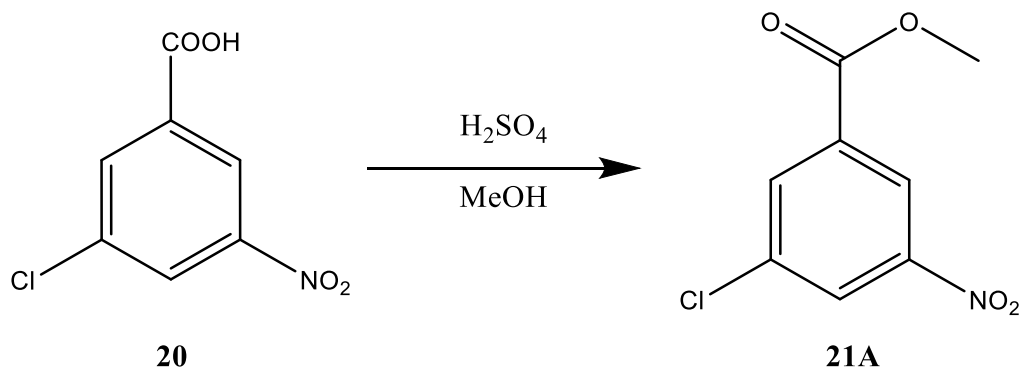


*Schéma 11 – Příprava 3-chlor-5-nitrobenzoová kyseliny 20*

**20: 3-chlor-5-nitrobenzoová kyselina (20)**

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	201,56 g/mol
Teoretický výtěžek:	2,213 g
Praktický výtěžek:	1,655 g (75 %)
Teplota tání:	143-145 °C

H. Jako další reakce byla provedena esterifikace připravené 3-chlor-5-nitrobenzoové kyseliny (1,5 g, 7,44 mmol) (**20**). Ta byla rozpuštěna v MeOH (25 ml) a okyselena koncentrovanou kyselinou sírovou 96% (0,04 ml). Směs byla poté zahřívána za varu po dobu 6 hodin. Na TLC se i po 6 hodinách a přidavku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,02 ml) ukázalo, že v reakční směsi zůstává stále malý podíl výchozí látky. Reakční směs byla proto zneutralizována nasyceným NaHCO<sub>3</sub> (30 ml) a extrahována EtOAc (3 × 40 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena. Vodná fáze byla následně okyselena pomocí HCl na pH 3-4 a zpětně uvolněná kyselina **20** byla vyextrahována EtOAc (3 × 30 ml). Takto bylo zpětně získáno 440 mg výchozí kyseliny **19** a 1,09 g methylesteru **21A**.

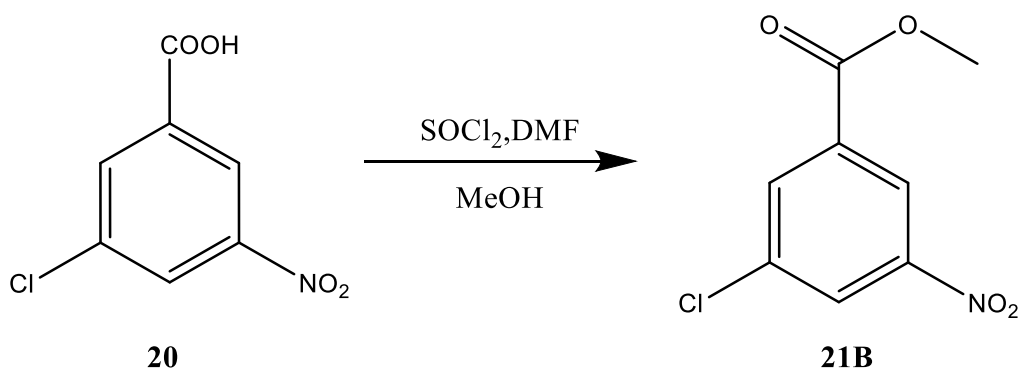


*Schéma 12 – Esterifikace připravené kyseliny 20*

### 21A: Methylester kyseliny 3-chlor-5-nitrobenzoové (21A)

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	215,59 g/mol
Teoretický výtěžek:	1,604 g
Praktický výtěžek:	1,09 g (68 %)
Teplota tání:	72-74 °C

- I. Zpětně získaných 440 mg kyseliny **20** (1 eq, 2,18 mmol) bylo opět rozpuštěno v MeOH (30 ml), ochlazeno ledem na 5 °C. Poté bylo pomalu přidáno (2,5 eq, 0,6 g, 5,457 mmol) thionylchloridu a kapka *N,N*-dimethylformamidu. Směs byla poté míchána 3 hodiny při pokojové teplotě a následně zahřáta na 60 °C a míchána další 2 hodiny. Reakční směs byla zpracována, stejným způsobem jako v předchozí reakci H, včetně reextrakce menšího množství výchozí kyseliny, která byla v reakční směsi stále přítomna. Touto reakcí bylo získáno 350 mg methylesteru **21B**.



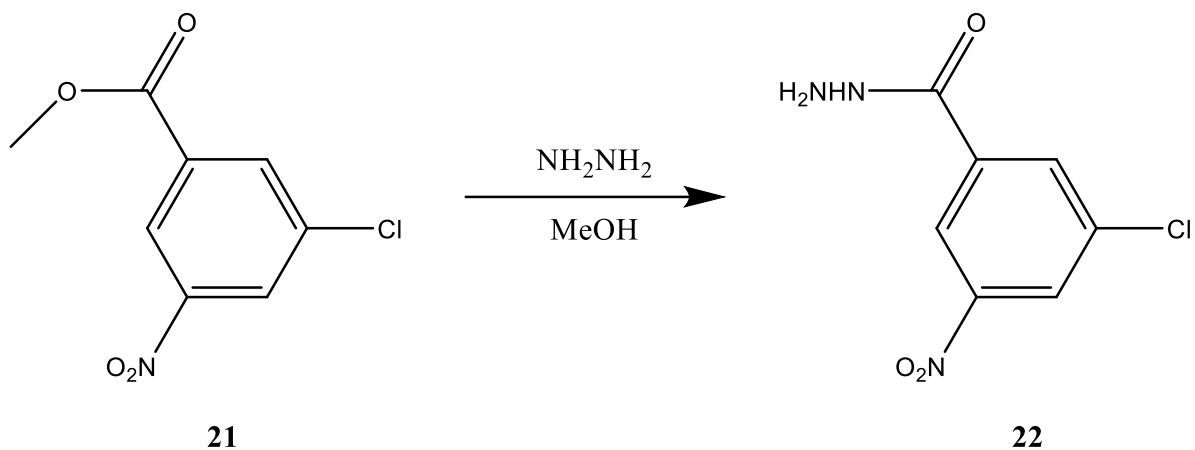
*Schéma 13 – Opětovná esterifikace připravené kyseliny 20*

### 21B: Methylester kyseliny 3-chlor-5-nitrobenzoové (21B)

Vzhled:	bílá krystalická látka
Molární hmotnost:	215,59 g/mol
Teoretický výtěžek:	470 mg
Praktický výtěžek:	350 mg (74 %)
Teplota tání:	72-74 °C

- J. Obě připravené frakce methylesteru (**21A**, **21B**) byly spojeny do jedné (**21**) (dohromady 1 eq, 1,44 g, 6,682 mmol) a rozpuštěny v MeOH (45 ml). K roztoku byl přidán hydrazin monohydrát (3 eq, 1,004 g monohydrátu – tedy 0,64 g/20,04 mmol čistého hydrazidu) a směs byla míchána za varu rozpouštědla 7 hodin. Reakční směs byla odpařena.





*Schéma 14 – Tvorba hydrazidu 22 z připraveného esteru 21*

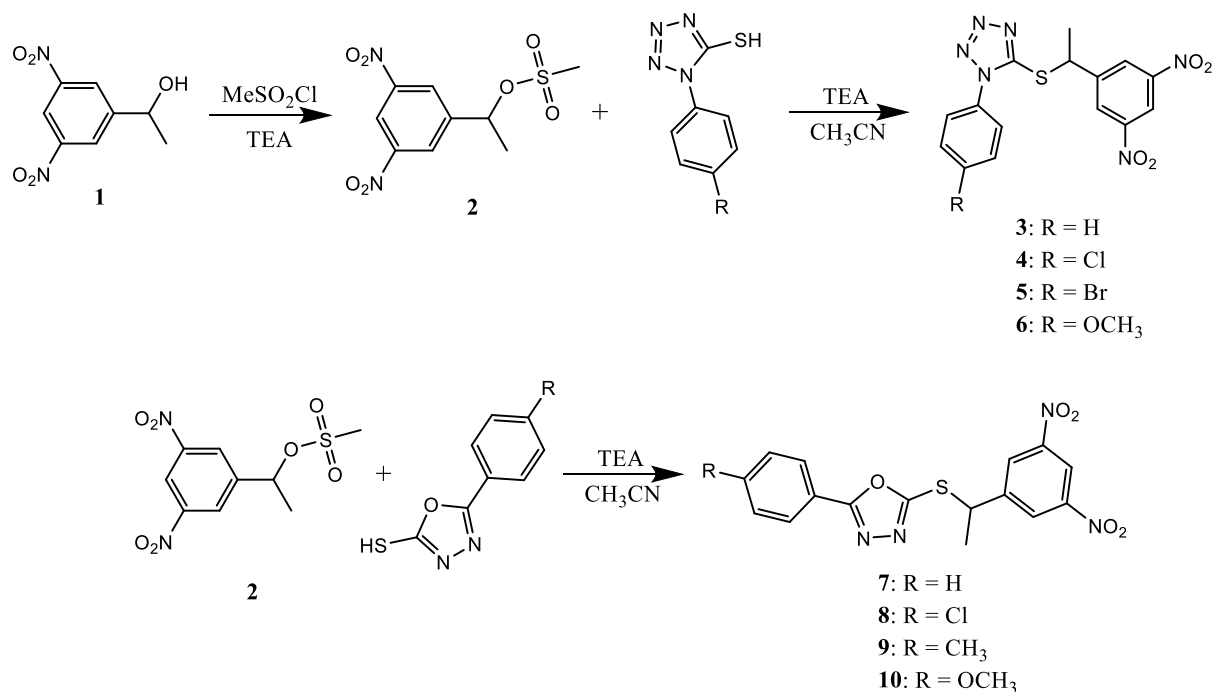
**22: 3-chlor-5-nitrobenzoylhydrazid**

Vzhled:	bílá narůžovělá krystalická látka
Molární hmotnost:	215,59 g/mol
Teoretický výtěžek:	1,44 g
Praktický výtěžek:	1,284 g (89 %)
<sup>1</sup> H NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 10,14 (br s, 1H), 8,54 (d, <i>J</i> = 1,7 Hz, 1H), 8,37 (t, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H), 8,25 (t, <i>J</i> = 1,8 Hz, 1H), 4,66 (br s, 2H)
<sup>13</sup> C NMR	(151 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) δ 162,66, 149,15, 136,64, 134,84, 133,37, 126,14, 121,20

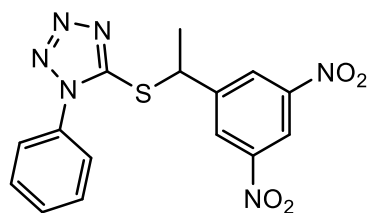
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1. Příprava látek v této práci

V rámci této práce byly připraveny nové látky potenciálně účinné proti TB, které byly odvozeny od dříve připravených a studovaných potenciálních AT na pracovišti školitele. Cílem první části práce bylo připravit analoga se stericky chráněným atomem síry ve struktuře. Byla vytvořena jedna série 1*H*-tetrazolů a jedna série 1,3,4-oxadiazolů, obě opírající se o již vyvinuté a testované struktury s velmi dobrou aktivitou proti TB. V rámci syntézy byly využity ověřené postupy, jako příprava 1-(3,5-dinitrofenyl)ethanolu, jeho převedení na reaktivní mesylát a následně alkylační reakce pro přípravu finálních látek (*Schéma 15*). Tyto postupy jsme použili pro I. a II. sérii. Celkem byly připraveny čtyři zástupci tetrazolové a čtyři zástupci oxadiazolové řady. Každý zástupce obou sérií se lišil substitucí v poloze 4 na benzenovém jádře. U tetrazolové řady se jedná o fenyl (**3**), chlorfenyl (**4**), bromfenyl (**5**) a methoxyfenyl (**6**) substituce (*Obrázek 25*). U oxadiazolové řady se jedná o fenyl (**7**), chlorfenyl (**8**), *p*-tolyl (**9**) a methoxyfenyl (**10**) (*Obrázek 26*). Z důvodu chyby při odesílání ovšem nebyl na testování zaslán jeden z derivátů řady tetrazolové, konkrétně její methoxy derivát.

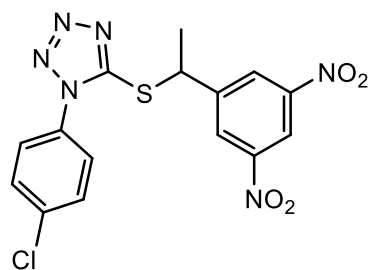


*Schéma 15 – Celkový přehled syntézy pro I. a II. sérii*



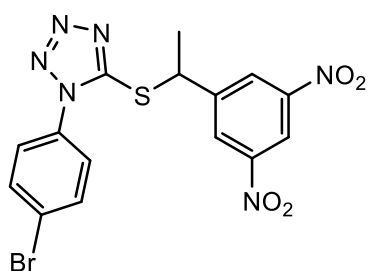
**3**

115,6 mg (93 %)



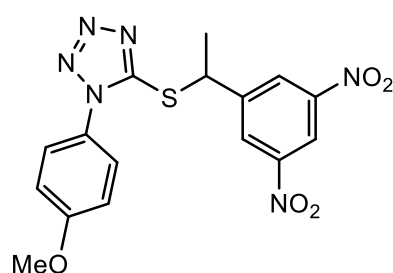
**4**

96 mg (71 %)



**5**

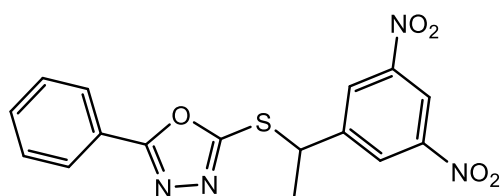
130 mg (79 %)



**6**

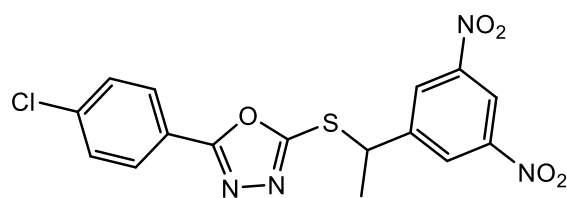
93 mg (67 %)

Obrázek 25 – Přehled připravených látek v I. sérii



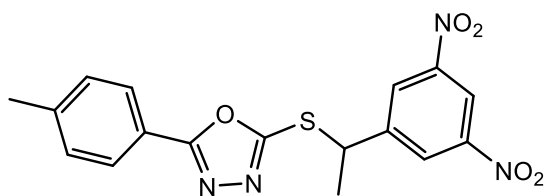
**7**

75 mg (58 %)



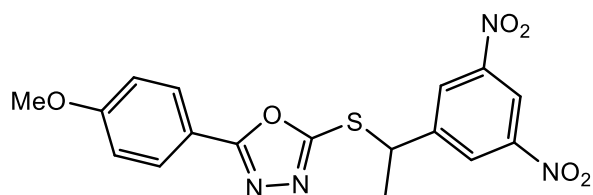
**8**

40 mg (29 %)



**9**

60 mg (47 %)



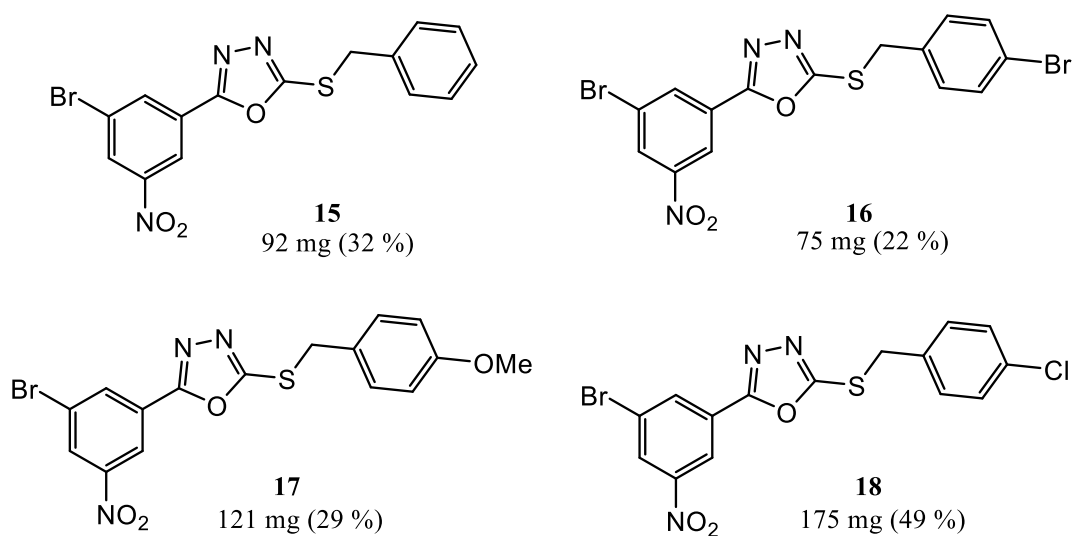
**10**

80 mg (53 %)

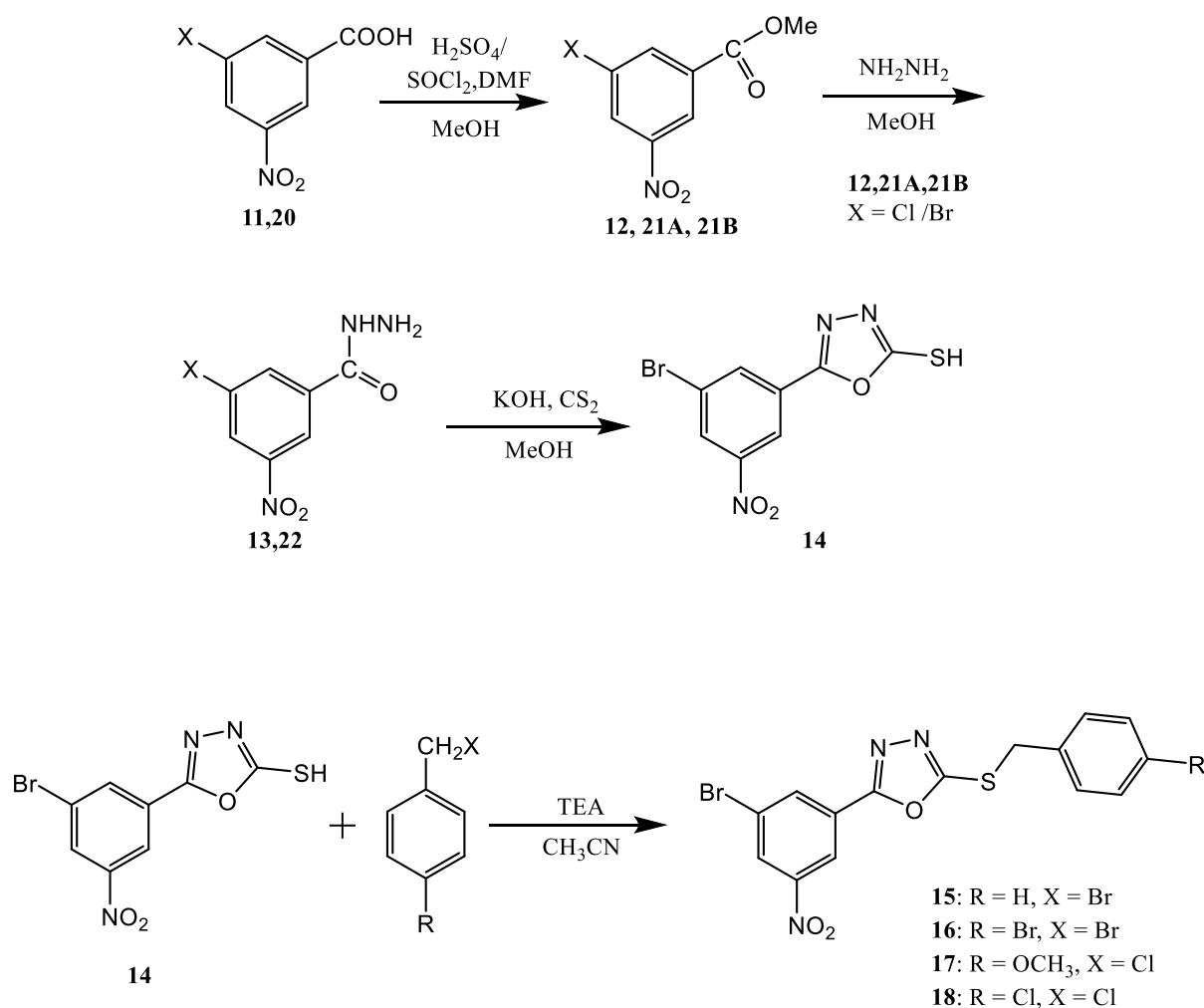
Obrázek 26 – Přehled připravených látek ve II. sérii

Dále byly připraveny reverzní deriváty oxadiazolové řady, které již v minulosti při substituci jedné z nitroskupin elektron odtahujícím substituentem (např. CF<sub>3</sub>) prokázaly dobrou

účinnost<sup>48</sup>. Z toho důvodu byla připravena série obsahující místo jedné z nitroskupin brom zahrnující čtyři finální struktury: fenyl (**15**), bromfenyl (**16**), methoxyfenyl (**17**) a chlorfenyl (**18**) derivát (Obrázek 27). Byla započata reakce vedoucí k derivátům obsahujících místo jedné nitroskupiny chlor, kde nejnovější výsledný produkt je hydrazid. I v tomto případě bylo vycházeno z ověřených postupů, konkrétně z přípravy dané karboxylové kyseliny, její přeměny na ester, následné reakce na příslušný hydrazid, jeho transformace na 1,3,4-oxadiazol-2-thiol a finální alkylace příslušným činidlem (Schéma 16).



Obrázek 27 – Přehled připravených látek ve III. sérii



*Schéma 16 – Přehled syntézy pro III. sérii a první reakce reverzních Cl derivátů*

Ve III. sérii se jako poměrně problematické ukázalo nalezení adekvátních poměrů pro mobilní fáze TLC, prokazatelně zobrazující všechny frakce v reakcích (kapitola 4.4 reakce C a D). Navzdory vyzkoušení různých fází o různých poměrech zůstávaly retenční faktory poměrně blízko u sebe. Z toho důvodu bylo rozhodnuto neprovádět sloupcovou chromatografií a pokračovat s produkty v následujících reakcích. Nehledě na to byly finální produkty poměrně snadno oddělitelné od nečistot. Tři z derivátů byly vyčištěny pomocí rozdílné rozpustnosti oproti nečistotám v etheru. Nicméně methoxy derivát byl purifikován díky pokusu o jeho přečištění sloupcovou chromatografií v hexanu:EtOAc 3:1, kdy se ukázalo, že frakce, která zůstala v baňce po přidání této směsi, je čistý produkt. Ten byl následně přefiltrován na Büchnerově nálevce.

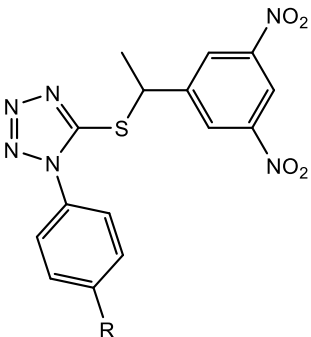
## 5.2. Výsledky antimykobakteriální účinnosti *in vitro*

Všechny finální látky z I., II. a III. série byly odeslány (pozn. autora z první série nebyl k testování omylem odeslán methoxy derivát **6** a látky ze III. série byly poslány těsně před odevzdáním této práce, z toho důvodu výsledky jejich účinnosti nebudou v této práci zmíněny) na specializované pracoviště v Ostravě (Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě), za účelem otestování jejich antimykobakteriální aktivity *in vitro*. Látky byly testovány celkem na třech kmenech mykobakterií, konkrétně na *M. tuberculosis* a dvou netuberkulózních kmenech *M. avium*, *M. kansasii*. Pro snazší porovnání výsledků byla vytvořena tabulka s účinností AT první linie proti těmto kmenům. (Tabulka 2). Pro porovnání jsou uvedeny také hodnoty MIC předlokových tetrazolových a oxadiazolových sloučenin.

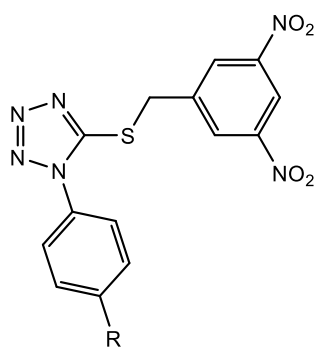
Tabulka 2 – Účinnost léčiv I. linie proti TB, (hodnoty uvedeny jako MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )

Léčivo Mykobakterie	Etambutol	Isoniazid	Rifampicin
<i>M. avium</i>	–	<b>&gt;250 / &gt;250</b> (14 / 21 dní) <sup>47,53</sup>	<b>31</b> (14 dní) <sup>53,54</sup>
<i>M. kansasii</i>	–	<b>4 / 4 / 4</b> (7/14/21 dní) <sup>47,53</sup>	<b>0,125</b> (14 dní) <sup>53,54</sup>
<i>M. tuberculosis</i>	<b>7,8</b> (7 dní) <sup>52</sup>	<b>0,5 / 1</b> (14 / 21 dní) <sup>47,53</sup>	<b>0,25</b> (14 dní) <sup>53,54</sup>

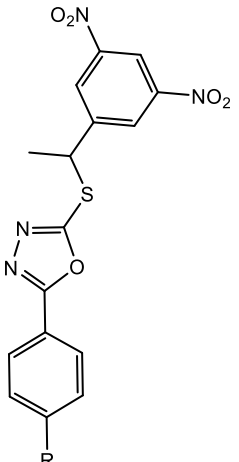
Tabulka 3 – Naměřené hodnoty účinnosti látek 3-5 (hodnoty uvedeny jako MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )

	Látky	3 (R = H)	4 (R = Cl)	5 (R = Br)
	Mykobakterie			
<i>M. avium</i> (14 / 21 dní)		>1000 / >1000	500nárůst / 500nárůst	>1000 / >1000
<i>M. kansasii</i> (7 / 14 / 21 dní)		16 / 32 / >32	500nárůst / 500nárůst / 500nárůst	4 / 8 / 16
<i>M. tuberculosis</i> (14 / 21 dní)		>32 / >32	500nárůst / 500nárůst	8 / 16

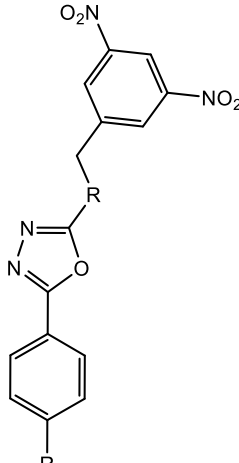
Tabulka 4 – Naměřené hodnoty předlohových sloučenin 1H-tetrazolů (hodnoty uvedeny jako MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )<sup>46</sup>

	Látky			
	Mykobakterie	(R=H)	(R = Cl)	(R = Br)
	<i>M. avium</i> (14 / 21 dní)	62 / 62	125 / 125	125 / 125
	<i>M. kansasii</i> (7/ 14 / 21 dní)	2 / 4 / 16	2 / 4 / 4	1 / 2 / 2
<i>M. tuberculosis</i> (14 / 21 dní)	4 / 4	1 / 2	1 / 1	

Tabulka 5 – Naměřené hodnoty antimykobakteriální aktivity látek 7-10 (hodnoty uvedeny jako MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )

	Látky				
	Mykobakterie	7 (R = H)	8 (R = Cl)	9 (R = CH <sub>3</sub> )	10 (R = OCH <sub>3</sub> )
	<i>M. avium</i> (14 / 21 dní)	250nárůst / 250nárůst	250nárůst / 250nárůst	250nárůst / 250nárůst	250nárůst / 250nárůst
	<i>M. kansasii</i> (7/ 14 / 21 dní)	1 / 2 / 4	1 / 2 / 4	1 / 2 / 4	1 / 2 / 4
<i>M. tuberculosis</i> (14 / 21 dní)	2 / 4	2 / 4	2 / 4	2 / 4	

Tabulka 6 – Naměřená účinnost předlohových 1,3,4-oxadiazolů (hodnoty uvedeny jako MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )<sup>47</sup>

	Látky				
	Mykobakterie	(R = H)	(R = Cl)	(R = CH <sub>3</sub> )	(R = OCH <sub>3</sub> )
	<i>M. avium</i> (14 / 21 dní)	16 / 32	>125 / >125	16 / 32	8 / 16
	<i>M. kansasii</i> (7 / 14 / 21 dní)	0,5 / 1 / 1	0,125 / 0,25 / 0,25	0,125 / 0,25 / 0,25	0,06 / 0,06 / 0,06
<i>M. tuberculosis</i> (14 / 21 dní)	0,06 / 0,06	0,125 / 0,125	0,125 / 0,125	≤0,03 / ≤0,03	

## 6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo rozšířit znalosti o vztazích mezi strukturou a účinkem u antimykobakteriálně aktivních 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1*H*-tetrazolů, 1,3,4-oxadiazolů a reverzních 3,5-dinitrofenyl-1,3,4-oxadiazolů. Bylo připraveno celkem dvanáct finálních látek, z toho čtyři tetrazolové deriváty s methylovým stíněním síry (I. série, kapitola 4.2), čtyři oxadiazolové deriváty s methylovým stíněním síry (II. série, kapitola 4.3) a čtyři reverzní oxadiazolové deriváty s náhradou jedné nitroskupiny za brom (III. Série, kapitola 4.4).

První série látek pouze v případě brom derivátu vykazala uspokojivé hodnoty účinnosti proti *M. tuberculosis*. Všechny další testované látky této série vykazaly podstatně horší účinnost proti mykobakteriím ve srovnání s léčivou první linie (*Tabulka 2, Tabulka 3*) a lze tedy říct, že u těchto struktur sterické stínění atomu síry nenapomůže účinnosti dané molekuly.

Ve II. sérii je vidět obecné snížení účinku u všech látek (*Tabulka 5*), ovšem hodnoty účinnosti proti jednotlivým kmenům se kromě *M. avium* pohybují stále ve velmi dobrých hodnotách MIC, srovnáme-li je například s léčivou první linie (*Tabulka 2*). Jejich účinnost na *M. tuberculosis* a *M. kansasii* se pohybuje v rozmezí MIC 1-8  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a jedná se tak o neúčinnější látky připravené v rámci této práce.

Poslední, III. série., zahrnuje úspěšně syntetizované čtyři finální látky, které jsou momentálně testovány proti mykobakteriím *in vitro*. Rovněž se v rámci této série podařilo úspěšně provést první kroky k tvorbě reverzních oxadiazolových derivátů, které budou obsahovat místo jedné nitroskupiny chlor.

Látky připravené v této práci účinností výrazně nepřevyšují léčiva první linie proti TB. Nicméně látka **5** vykazala podobné hodnoty jako etambutol, látky **7, 8, 9** a **10** vykazaly dokonce lepší hodnoty než etambutol. Ve srovnání s isoniazidem mají látky **7-10** mírně horší účinnost proti *M. tuberculosis*, v účinnosti proti *M. kansasii* ho ale překonávají.

Obecně však lze říct, že methylové sterické chránění síry ani v jednom případě nevedlo ke zvýšení aktivity proti mykobakteriím. I tak si některé připravené struktury udržely velmi dobrou účinnost proti mykobakteriálním kmenům, která se blížila hodnotám léčiv první linie a v některých případech je dokonce překonávala.



## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 World Health Organization – Tuberculosis [online]. 2021 [cit. 30.7.2022]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- 2 WHO – Global tuberculosis report 2021 [online]. 2021 [cit. 30.7.2022]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
- 3 WHITTLESEA, C.; HODSON, K.; Clinical Pharmacy and Therapeutics 6th edition. ISBN: 978-0-7020-7012-9, ISBN 978-0-7020-7012-9 international
- 4 NHS – Tuberculosis, causes (TB) [online]. 2019 [cit. 30.7.2022]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/causes/>
- 5 KHAN, MK.; ISLAM, MN.; et al. An Overview on Epidemiology of Tuberculosis. Mymensingh Med J. 2019 Jan;28(1):259-266. PMID: 30755580.
- 6 NHS – Tuberculosis, symptoms (TB) [online]. 2019 [cit. 30.7.2022]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/symptoms/>
- 7 NHS – Tuberculosis, diagnosis (TB) [online]. 2019 [cit. 30.7.2022]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/diagnosis/>
- 8 Rapid communication: key changes to the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2022 (WHO/UCN/TB/2022.2). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 9 WHO – Consolidated Guidelines on Tuberculosis, Module 4: Treatment - Drug-Resistant Tuberculosis Treatment [online]. 2020 [cit. 31.7.2022]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048>
- 10 WHO – Library Cataloguing-in-Publication Data: Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed. WHO/HTM/TB/2009.420 1.Antitubercular agents – administration and dosage. 2.Tuberculosis, Pulmonary – drug therapy. 3.National health programs. 4.Patient compliance. 5.Guidelines. I.World Health Organization. Stop TB Dept. ISBN 978 92 4 154783 3 (NLM classification: WF 360)
- 11 NHS – Tuberculosis, treatment (TB) [online]. 2019 [cit. 31.7.2022]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/treatment/>
- 12 Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- 13 World Health Organization. Treatment of drug-susceptible tuberculosis: rapid communication. Geneva, Switzerland: WHO, 2021., ISBN 978-92-4-155000-0
- 14 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, MUDr. Václav Bártů – Tuberkulóza a její rezistentní formy [online]. 2019 [cit. 1.8.2022]. Dostupné z: <https://pneumologie.lf1.cuni.cz/informace-o-tbc>

- 15 Working group on new TB drugs [online]. 2022 [cit. 2.8.2022]. Dostupné z:  
<https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>
- 16 WHO – Operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment – drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- 17 UpToDate – Isoniazid: An overview (Richard H Drew, PharmD, MS, FCCP, FIDP) [online]. 2021 [cit. 3.8.2022]. Dostupné z:<https://www.uptodate.com/contents/isoniazid-an-overview>
- 18 Isoniazid – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 3.8.2022]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00951>
- 19 Isoniazid, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 3.8.2022]. Dostupné z:  
<https://reference.medscape.com/drug/isoniazid-342564>
- 20 Rifampicin – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 3.8.2022]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB01045>
- 21 Rifampicin, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2016 [cit. 3.8.2022].  
<https://reference.medscape.com/drug/rifadin-rimactane-rifampin-342570>
- 22 Etambutol – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 3.8.2022]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00330>
- 23 Souhrn údajů o přípravku: Sural 400MG TBL NOB 100 [online]. c2021 [cit. 3.8.2022].  
Dostupné z:  
<https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0003023&tab=texts>
- 24 Etambutol, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z:  
<https://reference.medscape.com/drug/myambutol-ethambutol-342677>
- 25 Pyrazinamide – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00339>
- 26 Pyrazinamide, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z:  
<https://reference.medscape.com/drug/pyrazinamide-342678>
- 27 Moxifloxacin – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB00218>
- 28 Moxifloxacin, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z:  
<https://reference.medscape.com/drug/avelox-moxifloxacin-systemic-moxifloxacin-342537>
- 29 Levofloxacin, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 4.8.2022]. Dostupné z:  
<https://reference.medscape.com/drug/levaquin-levofloxacin-systemic-levofloxacin-342532>
- 30 Bedaquiline – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 5.8.2022]. Dostupné z:  
<https://go.drugbank.com/drugs/DB08903>

- 31 Bedaquiline, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 5.8.2022]. Dostupné z: <https://reference.medscape.com/drug/sirturo-bedaquiline-999799>
- 32 Linezolid – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 5.8.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00601>
- 33 MAARTENS, G.; BENSON, CA.; Linezolid for Treating Tuberculosis: A Delicate Balancing Act. *EBioMedicine*. 2015 Oct 21;2(11):1568-9. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.014. Erratum in: *EBioMedicine*. 2016 Jan;3:191. PMID: 26870767; PMCID: PMC4740312
- 34 Cycloserine – DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 5.8.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00260>
- 35 Cycloserine, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2022 [cit. 5.8.2022]. Dostupné z: <https://reference.medscape.com/drug/seromycin-cycloserine-342660>
- 36 Terizidone – TB DRUG MONOGRAPHS [online]. c2021 [cit. 6.8.2022]. Dostupné z: <http://www.tbdrugmonographs.co.uk/terizidone.html>
- 37 Delamanid – DrugBank Online [online]. c2021 [cit. 6.8.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11637>
- 38 The Use of Delamanid in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis: Interim Policy Guidance. Geneva: World Health Organization; 2014. PMID: 26110189
- 39 Souhrn údajů o přípravku: Delyba 50MG FLM 48 [online]. c2022 [cit. 7.8.2022]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0210404&tab=texts>
- 40 Pretomanid – DrugBank Online [online]. c2021 [cit. 10.8.2022]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01163>
- 41 Pretomanid, Dosing & Uses – Medscape [online]. c2019 [cit. 10.8.2022]. Dostupné z: <https://reference.medscape.com/drug/pretomanid-1000352>
- 42 Macozinone (MCZ, PBTZ-169) - Working Group for New TB Drugs [online]. c2020 [cit. 10.8.2022]. Dostupné z: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/macozinone-mcz-pbtz-169>
- 43 BTZ-043 - Working Group for New TB Drugs [online]. c2020 [cit. 10.8.2022]. Dostupné z: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/btz-043>
- 44 SQ109 (Telacebek) - Working Group for New TB Drugs [online]. c2022 [cit. 10.8.2022]. Dostupné z: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/telacebec-q203>
- 45 GSK-286 - Working Group for New TB Drugs [online]. c2022 [cit. 11.8.2022]. Dostupné z: <https://www.newtbdrugs.org/pipeline/compound/gsk-286>
- 46 KARABANOVICH, G.; ROH, J. et al. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents

- active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, 82, 324-340. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.069
- 47 KARABANOVICH, G.; ZEMANOVÁ, J. 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 Mar 24;59(6):2362-80. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00608
- 48 KARABANOVICH, G.; NĚMEČEK, J. 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 Jan 27;126:369-383. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.11.041
- 49 HIROKI, S.; KAZUHIRO, T.; et al. Asymmetric Reduction of 3,5-Dinitroacetophenone Using CT Complexation with Optically Active 1,12-Dialkylbenzo[c]phenanthrenes. *Chemistry Letters*, 2008, vol. 37, # 2, p. 158–159 doi: 10.1246/cl.2008.158
- 50 RICHARDS, J. E.; PHILP, D. A reactive nitrene-based organogel that self-assembles from its constituents in chloroform *Chemical Communications*, 2016 Feb 25;52(28):4995–4998. doi: 10.1039/C6CC01259K
- 51 GARCZAREK, P.; JANCZAK, J. New multifunctional phosphonic acid for metal phosphonate synthesis, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1036, 2013, Pages 505-509, ISSN 0022-2860
- 52 RAKESH; BRUHN, D. et al. Pentacyclic Nitrofurans with In Vivo Efficacy and Activity against Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS One*. 2014, 9(2), e87909. DOI: 10.1371/journal.pone.0087909
- 53 ROH, J.; KARABANOVICH, G. et al. Development of water-soluble 3,5-dinitrophenyl tetrazole and oxadiazole antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017, 25(20), 5468-5476. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.08.010
- 54 NĚMEČEK, J.; SYCHRA P. et al. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 130, 419-432. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.02.058

## 8. SEZNAM ZKRATEK

AIDS	syndrom získaného selhání imunity, Acquired Immune Deficiency Syndrome
AT	antituberkulotika
ATP	adenosintrifosfát
COVID-19	onemocnění koronavirem 2019, Coronavirus Disease 2019
DD	denní dávka
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina, Deoxyribo Nucleic Acid
DprE1	dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-ribóza 2'-epimeráza
EA	elementární analýza
eq	ekvivalent
EtOAc	ethyl-acetát
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti, Human Immunodeficiency Virus
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace/ medián inhibiční koncentrace, The half maximal inhibitory concentration
IGRA	interferon- $\gamma$ release assays
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MDR-TB	multilékově rezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NBS	N-bromsukcinimid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NÚ	nežádoucí účinek/ky
PO	perorálně
RNA	ribonukleová kyselina, RiboNucleic Acid
RpsA	ribosomální protein S1
TB	tuberkulóza
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

WHO Světová zdravotnická organizace, World Health Organization  
XDR-TB extenzivní rezistentní forma tuberkulózy

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT

### 9.1. Seznam obrázků

Obrázek 1 – Incidence TB ve světě pro rok 2020.....	8
Obrázek 2 – Isoniazid .....	14
Obrázek 3 – Rifampicin .....	14
Obrázek 4 – Etambutol .....	15
Obrázek 5 – Pyrazinamid.....	15
Obrázek 6 – Levofloxacin.....	16
Obrázek 7 – Moxifloxacin .....	16
Obrázek 8 – Bedachilin.....	16
Obrázek 9 – Linezolid.....	17
Obrázek 10 – Cykloserin .....	17
Obrázek 11 – Terizidion .....	17
Obrázek 12 – Přehled vyvíjených AT ve stádiích preklinického a klinického vývoje, včetně AT čekajících na schválení.....	18
Obrázek 13 – Delamanid .....	19
Obrázek 14 – Pretomanid .....	19
Obrázek 15 – BTZ043 .....	20
Obrázek 16 – Makozinon.....	20
Obrázek 17 – Telacebek .....	20
Obrázek 18 – GSK286.....	20
Obrázek 19 – 1-substitované-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoly.....	21
Obrázek 20 – 5-substituované-2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazoly.....	22
Obrázek 21 – S-substituované-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-thioly.....	23
Obrázek 22 – 1H-tetrazolová analoga s přidáním methylové skupiny pro sterické stínění atomu síry v I. sérii .....	24
Obrázek 23 – 1,3,4-oxadiazolová analoga s přidáním methylové skupiny pro sterické stíněním atomu síry v II. sérii .....	24
Obrázek 24 – Reverzní analoga 1,3,4-oxadiazolů se záměnou jedné nitroskupiny za skupinu halogenovou v III. sérii.....	24
Obrázek 25 – Přehled připravených látek v I. sérii.....	43
Obrázek 26 – Přehled připravených látek ve II. sérii.....	43
Obrázek 27 – Přehled připravených látek ve III. sérii .....	44

## 9.2. Seznam tabulek

Tabulka 1 – Rozdělení léčiv proti MDR-TB do skupin dle doporučení WHO <sup>9</sup> .....	13
Tabulka 2 – Účinnost léčiv I. linie proti TB, (hodnoty uvedeny jako MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )..	46
Tabulka 3 – Naměřené hodnoty účinnosti látek <b>3-5</b> (hodnoty uvedeny jako MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) .....	46
Tabulka 4 – Naměřené hodnoty předlokových sloučenin 1H-tetrazolů (hodnoty uvedeny jako MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) <sup>46</sup> .....	47
Tabulka 5 – Naměřené hodnoty antimykobakteriální aktivity látek <b>7-10</b> (hodnoty uvedeny jako MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) .....	47
Tabulka 6 – Naměřená účinnost předlokových 1,3,4-oxadiazolů (hodnoty uvedeny jako MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) <sup>47</sup> .....	47

## 9.3. Seznam schémat

Schéma 1 – Redukce výchozího ketonu na alkohol <b>1</b> .....	26
Schéma 2 – Mesylace alkoholu <b>1</b> .....	27
Schéma 3 – Příprava finálních 1H-tetrazolů <b>3-6</b> .....	28
Schéma 4 – Finální příprava 1,3,4 oxadiazolů <b>7-10</b> .....	30
Schéma 5 – Příprava 3-brom-5-nitrobenzoové kyseliny <b>11</b> .....	32
Schéma 6 – Příprava methylesteru <b>12</b> .....	33
Schéma 7 – Příprava benzohydrazidu <b>13</b> .....	34
Schéma 8 – Příprava 1,3,4 oxadiazol-2-thiolu <b>14</b> .....	35
Schéma 9 – Příprava finálních 1,3,4-oxadiazolů <b>15-18</b> .....	36
Schéma 10 – Příprava 3-amino-5-nitrobenzoové kyseliny <b>19</b> kyseliny .....	38
Schéma 11 – Příprava 3-chlor-5-nitrobenzoová kyseliny <b>20</b> .....	39
Schéma 12 – Esterifikace připravené kyseliny <b>20</b> .....	39
Schéma 13 – Opětovná esterifikace připravené kyseliny <b>20</b> .....	40
Schéma 14 – Tvorba hydrazidu <b>22</b> z připraveného esteru <b>21</b> .....	41
Schéma 15 – Celkový přehled syntézy pro I. a II. sérii .....	42
Schéma 16 – Přehled syntézy pro III. sérii a první reakce reverzních Cl derivátů.....	45