

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra organické a bioorganické chemie

SYNTÉZA AZA-ANALOGŮ SLOUČENIN S
VYSOKOU ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ
AKTIVITOU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

TOMÁŠ KHAJL

Vedoucí diplomové práce: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Hradec králové, 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením konzultanta). 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 31.8.2022

Tomáš Khajl

Velmi moc děkuji mé školitelce Ing. Galině Karabanovich, Ph.D. za vedení mé práce, za všechny poskytnuté rady, a hlavně za čas a trpělivost, kterou mi věnovala.

OBSAH

1.	Abstrakt.....	7
2.	Abstrakt.....	9
3.	Seznam použitých zkratk.....	11
4.	Úvod.....	13
4.1.	Tuberkulóza.....	13
4.2.	Léčba tuberkulózy.....	14
4.2.1.	Léčba lékově citlivých forem tuberkulózy.....	14
4.2.2.	Léčba rezistentní tuberkulózy.....	15
4.2.3.	Buněčná stěna mykobakterií.....	16
4.3.	Používaná léčiva v terapii tuberkulózy.....	18
4.3.1.	Léčiva 1. Linie.....	18
4.3.1.1.	Isoniazid.....	18
4.3.1.2.	Rifampicin.....	19
4.3.1.3.	Ethambutol.....	19
4.3.1.4.	Pyrazinamid.....	20
4.3.2.	Léčiva 2. linie.....	21
4.3.2.1.	Fluorochinolony.....	21
4.3.2.2.	Bedachilin.....	21
4.3.2.3.	Linezolid.....	22
4.3.2.4.	Clofazimin.....	22
4.3.2.5.	Delamanid.....	23
4.3.2.6.	Aminoglykosidy.....	24
4.3.2.7.	Pretomanid.....	24
4.3.3.	Další potencionální antimykobakteriální látky.....	25

4.3.3.1.	Benzothiazinony a další DprE1 inhibitory	25
4.4.	Výzkum na FaF UK	26
4.4.1.	Benzazoly	26
4.4.2.	Analoga benzimidazolů s modifikovaným heterocyklem.....	27
4.4.3.	Analoga s modifikovaným spojovacím řetězcem a R ₁ substitucí	28
5.	Cíl práce	30
6.	Experimentální část.....	31
6.1.	Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu	31
6.1.1.	Syntéza 3,5-dinitrobenzamidů	31
6.1.2.	Redukce 3,5-dinitrobenzamidů	32
6.1.3.	Syntéza 3,5-dinitrobenzylazidů.....	33
6.1.4.	Redukce azidů	34
6.1.5.	Syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylaminu	35
6.1.6.	Syntéza a hydrolyza 1-(3,5-dinitrobenzyl)tetraazaadamantan-1-ium chloridu	36
6.1.7.	Syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylamonium chloridu	37
6.1.8.	Syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzyl chloridu	38
6.1.9.	Optimalizace reakčních podmínek reakce 3,5-dinitrobenzyl chloridu s KSCN.....	39
6.2.	Syntéza 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů.....	41
6.2.1.	Charakterizace látek	41
6.3.	Syntéza 5-alkyl/aryl- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů	45

6.3.1.	Metoda A – pomocí pyridinu a tosylchloridu v THF.....	45
6.3.2.	Metoda B – pomocí EDC·HCl v DMSO	46
6.3.3.	Charakterizace produktů	46
6.4.	Alkylace <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu.....	50
7.	Výsledky a diskuze	51
7.1.	Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu	51
7.2.	Syntéza 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů.....	52
7.3.	Syntéza 5-alkyl/aryl- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů	52
7.4.	Alkylace 5-(4-chlorfenyl)- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu.....	53
7.5.	Výsledky antimykobakteriální účinnosti	54
8.	Závěr	56
9.	Seznamy obrázků, schémat a tabulek.....	58
9.1.	Seznam obrázků	58
9.2.	Seznam schémat	59
9.3.	Seznam tabulek	59
10.	Zdroje	61

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Autor: Tomáš Khajl

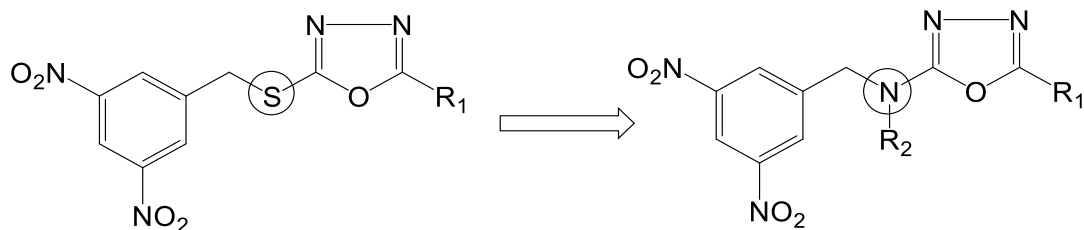
Školitel: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza aza-analogů sloučenin s vysokou antimykobakteriální aktivitou

Tuberkulóza (TB) je celosvětově rozšířené onemocnění, které je vyvoláváno především bakterií *M. tuberculosis*. TB je 13. nejčastější příčinou úmrtí a z pohledu úmrtí z důvodu infekčních nemocí byla v roce 2020 na 2. místě. TB je také nejčastější příčinou úmrtí u HIV-pozitivních osob. Z důvodu rostoucí rezistence na léčiva 1. linie a 2. linie je nutné se věnovat výzkumu nových antituberkulotik.

Diplomová práce navazuje na výsledky získané na KOBCH FaF UK, kde byly v předchozích letech vynalezené 5-alkyl/aryl-2-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazoly, které vykazovaly výbornou antimykobakteriální aktivitu, jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) dosahovala až 0,03 μM . Tato aktivita je o řády vyšší než má isoniazid, léčivo 1. linie při léčbě TB, který má hodnoty MIC 0,5 μM .

V předchozích pracích bylo ukázáno, že 3,5-dinitrofenylový fragment je klíčovým pro vysokou antimykobakteriální aktivitu a že deriváty s 1,3,4-oxadiazolový cyklem vykazují nejvyšší účinnost ve srovnání s 1*H*/2*H*-tetrazolovými a 1,2,4-triazolovými deriváty. Avšak zůstávala otázka vlivu síry ve spojovacím řetězci na aktivitu. Proto byla cílem této práce syntéza 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů, u kterých je síra ve spojovacím řetězci nahrazena atomem dusíku.



Syntéza 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů vychází z reakce acylhydrazidů s (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanatanem s následující cyklizací vzniklých 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů. V této práci byly provedeny pokusy o optimalizaci syntézy (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanatanu, byl zkoumán vliv rozpouštědla, teploty a poměru výchozích látek. Cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů byla provedena za dvou reakčních podmínek a byla porovnána výtěžnost reakcí. Taktéž bylo pokoušeno alkylovat připravené 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy.

V rámci práce se podařilo připravit 5 finálních látek, u kterých byla stanovena antimykobakteriální aktivita.

2. ABSTRAKT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Tomáš Khajl

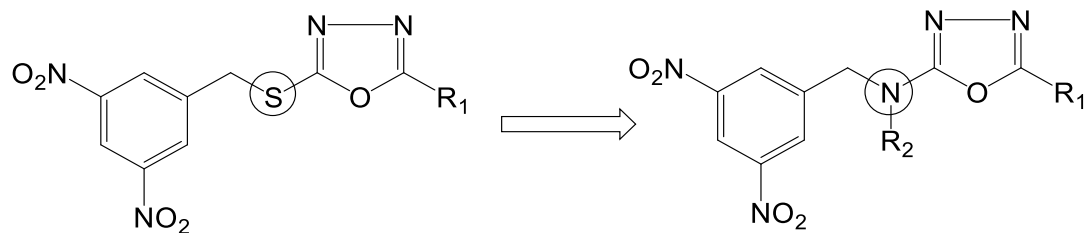
Supervisor: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Synthesis of aza-analogs of compounds with high antimycobacterial activity

Tuberculosis (TB) is widespread disease, caused by bacteria *M. tuberculosis*. TB is the 13th leading cause of death and was the 2nd leading cause of death from infectious diseases in 2020. TB is also the most common cause of death in HIV-positive people. Due to increasing resistance to 1st line and 2nd line drugs, research into new anti-TB drugs is needed.

This diploma thesis is based on previous results obtained at KOBCH FaF UK, where 5-alkyl/aryl-2-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazoles were invented. These 1,3,4-oxadiazoles showed excellent antimycobacterial activity with minimal inhibitory concentration (MIC) values of 0.03 μM . This activity is much higher than that of isoniazid, first-line antituberculous drug, which has MIC values of 0.5 μM .

In previous work, it has been shown that the 3,5-dinitrophenyl fragment is crucial to the high antimycobacterial activity and that derivatives with a 1,3,4-oxadiazole cycle show the highest potency compared to 1*H*/2*H*-tetrazole and 1,2,4-triazole derivatives. However, the question of the effect of sulfur in the linker chain on the activity remained. Therefore, the aim of this work was to synthesize 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazole-2-amines in which the sulfur in the linker chain is replaced by a nitrogen atom.



The synthesis of 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazole-2-amines is based on the reaction of acylhydrazides with (3,5-dinitrobenzyl)isothiocyanate followed by cyclization of formed 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemicarbazides. In the present work, attempts were made to optimize the synthesis of (3,5-dinitrobenzyl)isothiocyanate, and the effect of solvent, temperature and ratio of starting materials was investigated. The cyclization of 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemicarbazides was carried out under two reaction conditions and the yields of the reactions were compared. Alkylation of the prepared 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amines was also attempted.

In the current work, 5 final compounds were prepared and their antimycobacterial activity was evaluated.

3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADME	absorbce, distribuce, metabolismus, exkrece
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DprE1	dekaprenylfosforyl- β -D-ribóza 2'-epimeráza
Et ₂ O	diethylether
Et ₃ N	triethylamin
EtOAc	ethyl-acetát
EDC·HCl	hydrochlorid 1-ethyl-3-(3'-dimethyl-amino-propyl)karbodiimidu
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
INH	isoniazid
KOBCH FaF UK	Katedra organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy
MDR-TB	multilékově rezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
NMR	nukleární magnetická rezonance
RR-TB	rifampicin rezistentní tuberkulóza
THF	tetrahydrofuran
TB	tuberkulóza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

XDR-TB

extenzivně rezistentní tuberkulóza

4. ÚVOD

4.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je onemocnění způsobené bakteriemi komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, do kterého patří *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* a *M. caprae*¹. TB nejčastěji postihuje plíce a způsobuje plicní tuberkulózu. Můžou být ovšem zasaženy i jiné orgány jako ledviny, mozek, mícha² – v tomto případě se jedná o mimo plicní TB. V případě klinické manifestace onemocnění se jedná o aktivní TB; pokud pacient nevykazuje symptomy onemocnění, ale je přesto infikován *M.tuberculosis*, pak se jedná o latentní formu.³ Pokud jsou zasaženy minimálně 2 orgánové systémy jedná se o diseminovanou formu.⁴ Odhaduje se, že až 25% světové populace může mít latentní formu TB.⁵ Pacienti s latentní formou TB nepřenášejí, ale jsou ve vysokém riziku rozvoje aktivní formy TB.³ *M. tuberculosis* se přenáší kapénkovou cestou od jedinců s aktivní plicní TB. Riziko rozvoje z latentní formy do aktivní formy je 5-10% během života infikovaného jedince, ale nejvyšší riziko je v prvních 5 letech po infekci.³ Imunokompromitovaní jedinci například s HIV, malnutricí nebo diabetem mají toto riziko zvýšené, HIV infikovaní jedinci mají toto riziko až 18x větší.⁵

V roce 2020 zemřelo na TB 1,5 miliónu lidí, z toho 214 000 bylo infikováno HIV. TB je 13. nejčastější příčina úmrtí. Z pohledu infekčních nemocí je pak tuberkulóza v počtu úmrtí na 2. místě, na prvním místě byl v roce 2020 Covid-19. Ve stejném roce se odhaduje, že onemocnělo s TB 10 miliónů lidí.⁶ Podle WHO, 95% případů a úmrtí je evidováno v rozvojových zemích. V roce 2020 se 2/3 všech nových případů TB objevilo v 8 zemích: Indii, Číně, Indonésii, Filipínách, Pákistánu, Nigérii, Bangladéši a Jihoafrické republice.⁶

Symptomy se odvíjí dle lokalizace TB bakterií. Plicní forma zahrnuje dlouhotrvající kašel, bolest hrudi, expektorace krve nebo sputa. Mezi vedlejší symptomy pak patří slabost, únava, ztráta váhy, ztráta chuti k jídlu, horečka, noční pocení. Jedinci s latentní TB infekcí symptomy nemají.⁷ Symptomy u aktivní formy mohou být po několik měsíců velmi mírné, což může mít za následek zpožděné vyhledávání lékařské péče a infekci dalších jedinců. Odhaduje se, že jedinec s aktivní formou infikuje 5-15 dalších lidí během roku. Bez adekvátní péče

zemře 45% HIV-negativních lidí s aktivní formou TB, zatímco skoro všichni HIV-pozitivní jedinci s aktivní formou TB zemřou.⁶

Při podezření na TB se pacientovi odeberou vzorky sputa, v případě mimoplicní lokalizace se odeberou vzorky tělních tekutin nebo postižené tkáně. Vzorky se dále posílají na vyšetření pomocí molekulárních diagnostických testů, mikroskopického vyšetření a kultivaci v tekutém médiu. Je možné využít i skiagram hrudníku. V případě potvrzení přítomnosti TB se dále vyšetřuje citlivost na léčiva.⁷

Výskyt rezistentních kmenů *M. tuberculosis* je celosvětový problém, zhoršovaný nevhodným užíváním léků, špatnou preskripcí a neadherencí pacienta k dlouhodobé léčbě. MDR-TB (multidrug-resistant tuberculosis) je způsobována bakteriemi rezistentní na isoniazid a rifampicin. MDR-TB je léčitelná léčivy 2. linie, nicméně tato terapie nese řadu nevýhod zejména dlouhou dobu léčby (až 2 roky) a používané látky jsou často drahé a s více nežádoucími účinky. Účinnost terapie MDR-TB dosahovala v roce 2018 59 %. Jako XDR (extensive drug resistance) jsou označovány MDR kmeny dále rezistentní k fluorochinolonům a alespoň k jednomu parenterálnímu léčivu 2. linie (kapreomycin, kanamycin, amikacin). Můžeme se potkat s RR-TB (rifampicin resistant tuberculosis), u které jsou mykobakterie rezistentní k rifampicinu. Je několik důvodů vzniku a šíření rezistentních kmenů – užívání pouze jednoho léku místo kombinace, nedostatečná jakost léčiv či nevhodné skladování. Důležitým faktorem je i nedostatečná adherence k terapeutickému režimu, kdy pacient předčasně přerušil léčbu, či nedodrжуje správné dávkovací schéma.^{5,8}

4.2. Léčba tuberkulózy

4.2.1. Léčba lékově citlivých forem tuberkulózy

Léčba TB je dlouhodobá, podávání antituberkulotik trvá minimálně 6 měsíců. K léčbě se používá kombinace antituberkulotik, které se zpravidla podávají jednorázově v ranní dávce pod kontrolou ošetřujícího personálu. Léčba TB má za cíl vyléčit pacienta, zachovat jeho kvalitu života, předejít úmrtí, omezit přenos TB, zabránit vzniku rezistence a omezit pozdní následky onemocnění. Mezi základní antituberkulotika patří isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. Mezi důležité vlastnosti antituberkulotik spadá jejich baktericidní účinek, schopnost usmrtit semidormantní bakterie (sterilizační účinek) a prevence vzniku lékové

rezistence. Antituberkulotika se podávají v ranní dávce nalačno z důvodu snižování účinku některých antituberkulotik (isoniazid, pyrazinamid, rifampicin) při podávání s jídlem. Terapie léčiv 1. linie je efektivní při léčbě TB způsobené citlivými formami *M. tuberculosis*, terapie je pak účinná v 90% případů.⁹

V iniciální fázi léčby lékově citlivých forem TB se používá čtyřkombinace antituberkulotik (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol), tato fáze trvá minimálně 2 měsíce. Během této fáze se využívá baktericidního účinku léčiv, které rychle usmrtí subpopulaci dělicích se bakterií, zároveň kombinace s léčiv se sterilizačním účinkem usmrcuje i subpopulaci perzistujících, nedělicích se bakterií. V další pokračovací fázi se podává dvojkombinace antituberkulotik – isoniazid a rifampicin, trvá standardně 4 měsíce. Ani dlouhodobá kombinovaná terapie nemusí mít dostatečný efekt, jelikož část bakterií se může schovat do těžce pro léčivo dostupných kompartmentů jako jsou granulomy, kavity a abscesy. Čím déle je TB neléčená, tím více se bakterií takto uschová. Tyto spící bakterie jsou poté příčinou recidivit.⁹ Mimoplicní a diseminovaná TB vyžadují delší terapii, v případě kloubní nebo kostní TB trvá terapie 9 měsíců, při postižení centrální nervové soustavy pak i 12 měsíců.⁴

4.2.2. Léčba rezistentní tuberkulózy

Na základě výstupů meta analýz studující účinnost léčiv 2. linie aktualizovala WHO v roce 2020 svoje doporučené postupy. WHO rozděluje léčiva 2. linie do tří skupin (tabulka 1) podle jejich účinnosti a toxicity. Perorální podávání je preferováno pro většinu pacientů. Léčiva ze skupiny A (fluorochinolony (levofloxacin, moxifloxacin), bedachilin, linezolid) jsou silně doporučována pro dlouhodobou terapii MDR-TB, měli by být součástí iniciální terapie s výjimkou prokázání rezistence či rizika toxicity. Parenterálně podávaná léčiva (streptomycin, amikacin) mají zvýšené riziko nefrotoxicity, ototoxicity a špatnou adherenci k terapii. Při zvážení benefitů a rizika nejsou proto parenterální léčiva vhodná pro iniciální léčbu MDR-TB a měla by být podávána jen při prokázané citlivosti a při pečlivém monitoringu ztráty sluchu. Pro pacienty s MDR/RR-TB je doporučováno užívání všech 3 látek ze skupiny A a alespoň 1 léčivo ze skupiny B. Terapie by měla začínat s minimálně 4 léčivy, pokud nelze použít léčiva ze skupin A nebo B, teprve pak by se měla přidat léčiva skupiny C.¹⁰

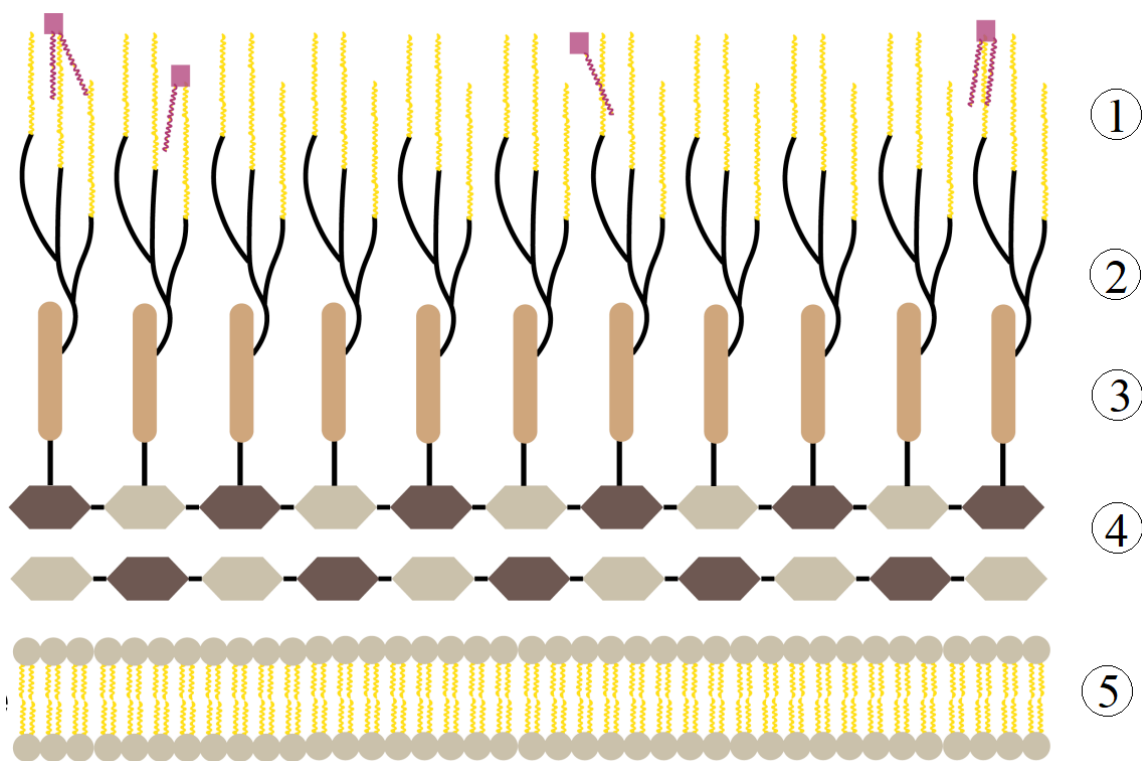
Skupina, postup	Léčivo
Skupina A použít všechny	Levofloxacin nebo moxifloxacin
	Bedachilin
	Linezolid
Skupina B přidat jednu nebo obě látky	Clofazimin
	Cykloserin nebo terizidon
Skupina C Na doplnění léčebného režimu, když nelze použít látky ze skupiny A a B	Ethambutol
	Delamanid
	Pyrazinamid
	Imipenem/cilastatin nebo meropenem
	Amikacin nebo streptomycin
	Ethionamid nebo prothionamid
	P-aminosalicylová kyselina

Tabulka 1: Léčiva 2. linie dle WHO¹⁰

4.2.3. Buněčná stěna mykobakterií

Mykobakterie jsou aerobní, pomalu rostoucí, gram-pozitivní bakterie s buněčnou stěnou bohatou na lipidy. Buněčná stěna se strukturou a složením odlišuje od ostatních gram-pozitivních i gram-negativních bakterií, obsahuje unikátní lipidy, které dávají mykobakteriím jedinečné vlastnosti: nízkou permeabilitu buněčné stěny, rezistenci na mnohá antibiotika a odolnost před vysušením.¹¹ Buněčná stěna se také podílí na několika důležitých procesech, jako jsou ochrana buňky, transport, virulence a patogenita, což dělá z buněčné stěny vhodným cílem pro nová léčiva.¹²

Buněčná stěna (Obrázek 1) je složena ze 2 vrstev polysacharidů, přímo nad cytoplazmatickou membránou je vrstva peptidoglykanu, která je tenčí než u ostatních gram-pozitivních bakterií. Nad ní se nachází vrstva polysacharidu arabinogalaktanu, která je kovalentně spojena s vrstvou peptidoglykanu a s vrstvou lipidů.¹³



Obrázek 1: Mykobakteriální buněčná stěna 1. glykolové lipidy 2. mykolové kyseliny 3. arabinogalaktan 4. peptidoglykan 5. cytoplasmatická membrána (převzato a upraveno: Harris, N.C., 2019)¹⁴

Lipidová vrstva je složena z unikátních lipidů, jedním z nich jsou mykolové kyseliny. Mykolové kyseliny jsou typické pro mykobakteriální buněčnou stěnu, představují až 60 % celkového složení. Strukturně se jedná o dlouhé 2-alkyl-3-hydroxy mastné kyseliny. Jsou kovalentně vázány s vrstvou polysacharidů – arabinogalaktanem. Ve spojení s lipidy buněčné stěny jsou uspořádány do dvojvrstvy a podílejí se na virulenci a flexibilitě buněčné stěny¹¹. Syntéza mykolových kyselin je místem účinku isoniazidu^{9,15} nebo delamanidu^{16,17}.

Lipidová vrstva také obsahuje glykolové lipidy, které jsou nekovalentně vázané a zprostředkovávají interakce s jinými membránami a receptory, umožňují tak regulaci imunitní reakce. Jedním z nich je lipoarabinomannan (LAM), který umožňuje přežití bakterie v hostiteli. LAM blokuje fúzi fagozomu makrofágu s kyselými lysozomy a tím zabraňuje usmrcení mykobakterie uvnitř makrofágu.¹⁸ LAM je složen z D-arabinofuranózy a mannopyranosylových zbytků.¹² Na arabinogalaktan a LAM cílí ethambutol, který inhibicí arabinosyltransferázy blokuje jejich syntézu.⁹

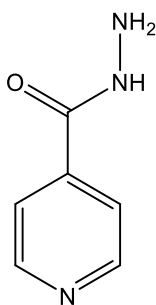
Dekaprenylfosforyl- β -D-ribóza-2'-epimerázy (DprE1 a DprE2) jsou důležité enzymy, které umožňují epimerizaci dekaprenylfosforyl-D-ribózy na dekaprenylfosforyl-D-arabínózu (DPA). DPA je klíčovou látkou pro další syntézu arabinogalaktanu v buněčné stěně. Tyto enzymy jsou potencionálním cílem nových léčiv – benzothiazinonů.¹²

4.3. Používaná léčiva v terapii tuberkulózy

4.3.1. Léčiva 1. Linie

4.3.1.1. Isoniazid

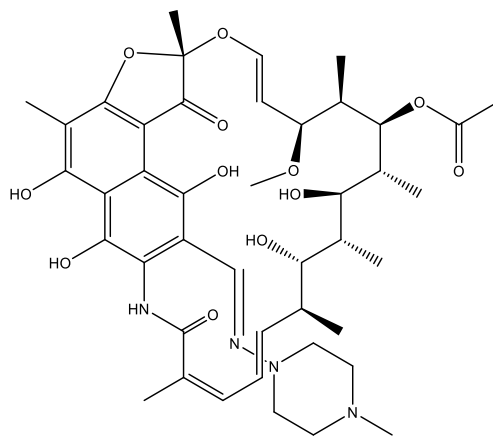
Isoniazid (Obrázek 2) účinkuje jak baktericidně na aktivně rostoucí bakterie, tak i bakteriostaticky na neaktivní formy. Působí jak na extracelulární, tak i na intracelulární aktivně rostoucí bakterie. Jedná se o velmi selektivní léčivo působící na *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, na ostatní mikroorganismy neúčinkuje. Isoniazid je proléčivo, které se aktivuje bakteriální katalázou. Po aktivaci inhibuje syntézu mykolových kyselin, které jsou nezbytnou součástí buněčné stěny. Má dobrou absorpci po perorálním podání, ovšem absorpce je snižena, pokud je isoniazid podán s potravou. Je metabolizován játry převážně acetylací na neaktivní metabolity, které se dále vylučují do moči. Rychlost biotransformace je geneticky podmíněná a pomalá acetylace může vést k růstu nežádoucích účinků.^{9,15}



Obrázek 2: Isoniazid

4.3.1.2. Rifampicin

Rifampicin (Obrázek 3) je semisyntetické antibiotikum produkované *Streptomyces mediterranei*. Jeho účinek je baktericidní, je účinný jak na *M. tuberculosis*, atypické mykobakterie tak i na *M. leprae*. Mechanismus účinku zahrnuje blokaci DNA dependentní RNA polymerázy následovanou inhibicí RNA syntézy a buněčnou smrtí. Z gastrointestinálního traktu je rychle vstřebáván, absorpce po perorálním podání je téměř 100%. Potrava v žaludku nicméně může značně snížit absorpci, podává se proto nalačno. Má dobrou distribuci do tělních tekutin, lymfatických uzlin tak i do tuberkulózních ložisek. Metabolizuje se játry a je vylučován z 60% stolicí a z 30% močí.^{9,19}

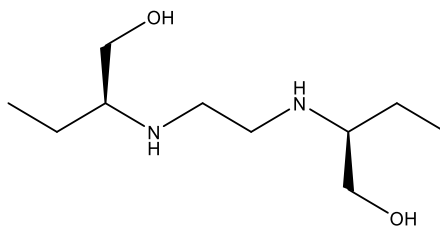


Obrázek 3: Rifampicin

4.3.1.3. Ethambutol

Ethambutol (Obrázek 4) je bakteriostatické léčivo, používaný v terapii plicní tuberkulózy. Působí specificky na rostoucí *M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. kansasii*, sterilizační aktivita je nicméně malá. Mechanismus účinku není zcela objasněn, předpokládá se, že po průniku do buňky bakterie inhibuje arabinosyltransferázu, což vede k blokování tvorby složek buněčné stěny jako jsou arabinogalaktan a lipoarabinomannan. Je účinný i na mykobakterie rezistentní vůči jiným antituberkulotikám a je podáván v kombinacích u pacientů s předpokládanou či potvrzenou rezistencí na isoniazid. 80% léčiva se absorbuje z gastrointestinálního traktu, absorpce není výrazně ovlivněna potravou. Dobře se distribuuje do

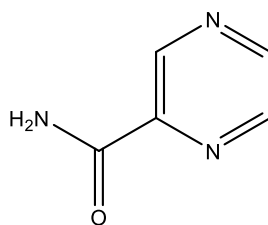
tkání, tak i do mateřského mléka, rovněž prochází placentou. Je částečně metabolizován játry a eliminuje se močí.^{9,20}



Obrázek 4: Ethambutol

4.3.1.4. Pyrazinamid

Pyrazinamid (Obrázek 5) působí vysoce specificky a baktericidně na *M. tuberculosis*. Účinkuje na pomalu i rychle rostoucí bakterie. Působí při kyselém pH, při odeznívajícím zánětu a s tím spojeným vzestupem pH ztrácí účinnost. Jakožto proléčivo je pyrazinamid dále konvertován na pyrazinovou kyselinu. Mechanismus účinku není plně objasněn, jedním z možných mechanismů je inhibice enzymu FAS (fatty acid synthase), který je nezbytný pro bakteriální syntézu mastných kyselin. Dalším možným mechanismem je akumulace pyrazinové kyseliny a následné narušení membránové potenciálu. Pyrazinová kyselina se rovněž váže na ribosomální protein S1 (RpsA) a inhibuje tak procesy translace. Absorbuje se téměř kompletně ze zažívacího traktu, distribuje se do většiny tkání. Aktivní metabolit je metabolizován játry a je eliminován ledvinami.^{9,21}

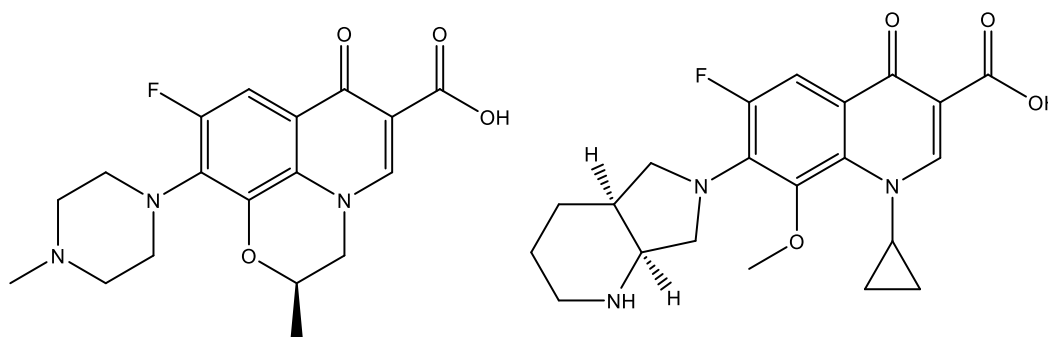


Obrázek 5: Pyrazinamid

4.3.2. Léčiva 2. linie

4.3.2.1. Fluorochinolony

Levofloxacin a moxifloxacin (Obrázek 6) představují první volbu při rezistentní TB nebo při intoleranci léčiv 1. linie dle doporučení WHO.^{10,22} Jsou to léčiva spadající do skupiny fluorochinolonů, mechanismus účinku je skrze inhibici DNA gyrázy a topoisomerázy IV. Fluorochinolony mají vhodné farmakokinetické vlastnosti v terapii TB, mají velmi dobrou biodostupnost a distribuují se i intracelulárně. Eliminují se ledvinami a játry. Měli by se užívat v kombinaci s alespoň dalšími 2 antituberkulotiky. Terapeutické monitorování hladin je vhodné pro dosažení maximální terapeutického účinku, obzvláště u pacientů s rizikem malabsorpce jako HIV pozitivní pacienti. Jsou dobře tolerované, nicméně vzácně se vyskytují závažné nežádoucí účinky, nejčastějším problémem jsou při terapii interakce s polyvalentními kationty – Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} . Tyto kationty mohou být součástí často užívaných léčiv jako jsou antacida nebo doplňků stravy, při současném užití s fluorochinolony jsou chelátovány a vzniká tak špatně absorbovatelný, nerozpustný komplex.^{23,24,25,26,27,28}

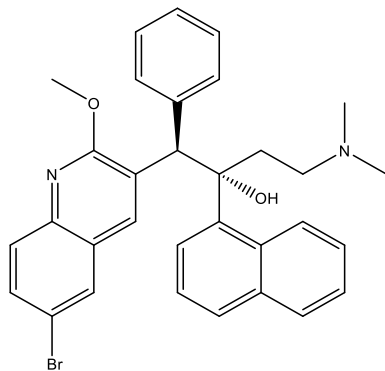


Obrázek 6: Ofloxacin (vlevo) a moxifloxacin (vpravo)

4.3.2.2. Bedachilin

Bedachilin (Obrázek 7) spadá do skupiny diarylchinolonů. Protonovaný bedachilin má vysokou afinitu k ATP syntázovému komplexu a tento komplex inhibuje. ATP syntázový komplex je odpovědný za produkci ATP, esenciální molekuly pro tvorbu energie v buňce. Bedachilin je metabolizován CYP3A4 enzymem na méně účinné aktivní metabolity. Jeho biologický poločas (173 hodiny) je poměrně dlouhý a umožňuje jeho intermitentní podávání v

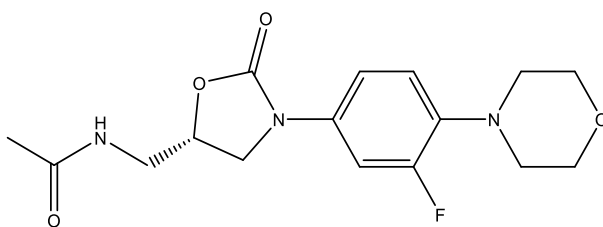
kombinaci s dalšími antituberkulotiky.^{29,30} Podává se vždy v kombinaci se čtyřmi dalšími antituberkulotiky. Před zahájením léčby je nutné pacienta vyšetřit pomocí elektrokardiogramu z důvodu prodlužování QT intervalu bedachilinem.⁹



Obrázek 7: Bedachilin

4.3.2.3. Linezolid

Linezolid (Obrázek 8) je oxazolidinonové antibiotikum, mechanismus účinku zahrnuje specifickou vazbu na místo 23S podjednotky 50S bakteriálního ribozomu, což zabraňuje translačnímu procesu. Po perorálním podání je absorpce rychlá a skoro 100% a není významně ovlivněna potravou. Distribuční objem je přibližně 40-50 litrů. Metabolizuje se oxidací morfolinového cyklu na neaktivní metabolity a je eliminován převážně močí.^{31,32}

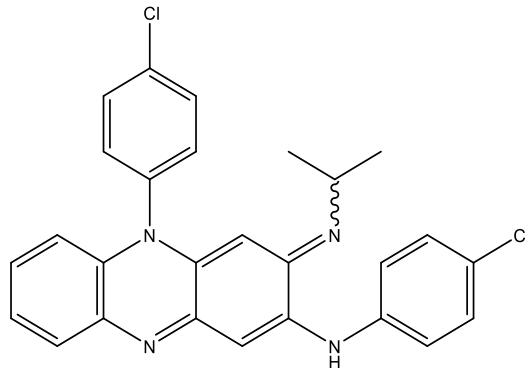


Obrázek 8: Linezolid

4.3.2.4. Clofazimin

Clofazimin (Obrázek 9) se využívá v terapii lepry, nověji pak i v terapii tuberkulózy. Mechanismus účinku není plně objasněn, předpokládá se, že působí skrze destabilizaci buněčné membrány, či skrze působení na bakteriální respirační řetězec nebo působením na iontové transportéry. Absorpce je pomalá a variabilní, pohybuje se v rozmezí 45–62 %,

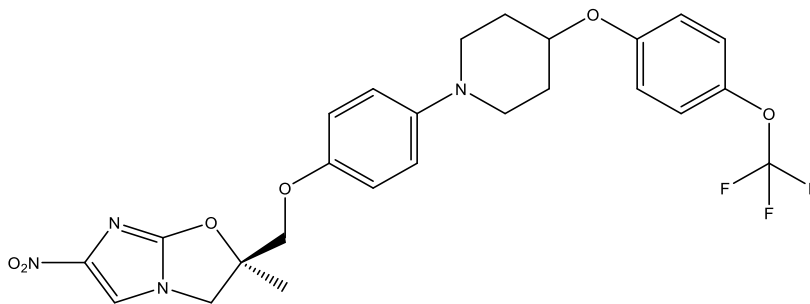
největší biodostupnost je při podávání s tučným jídlem, nevstřebaný podíl léčiva se vylučuje se stolicí. Clofazimin je velmi lipofilní a je deponován do tukové tkáně, odkud je dále distribuován pomocí makrofágů. Krystalizovaná látka byla objevena v lymfatických uzlinách, játrech, slezině, svalech, kostech a dalších tkáních. Je eliminován skrze žluč a stolicí, malá část je pak vylučována sputem a potem. Podíl renální exkrece je zanedbatelný.^{33,34}



Obrázek 9: Clofazimin

4.3.2.5. Delamanid

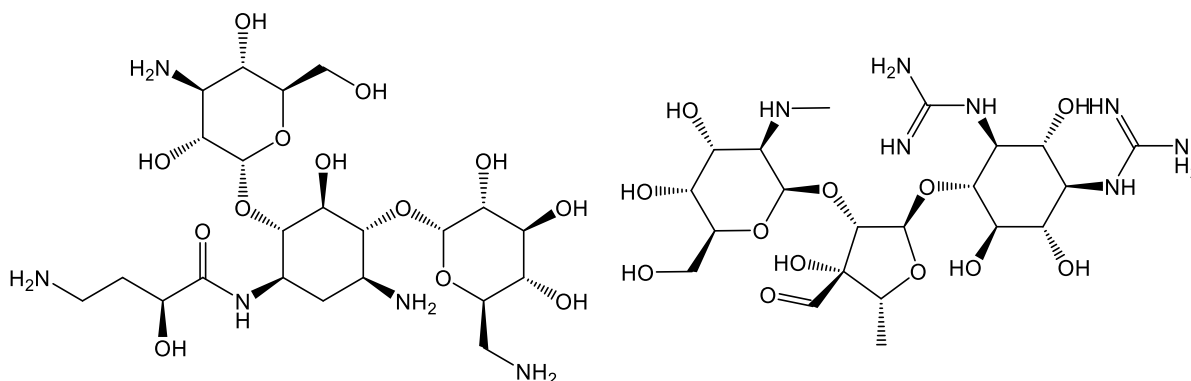
Delamanid (Obrázek 10) patří do skupiny nitro-dihydro-imidazooxazolových derivátů, inhibuje syntézu složek mykobakteriální buněčné stěny například methoxymykolové a ketomykolové kyseliny. Jedná se o proléčivo, které se se aktivuje enzymem deazaflavin dependentní nitroreduktázou (Rv3547). Biodostupnost se pohybuje v rozmezí 25–47 %, podávání s potravou zvyšuje absorpci. Vztah podané dávky a plazmatické koncentrace při perorálním podání je nelineární. Zdánlivý distribuční objem je 2,100 litrů. Je metabolizován v plazmě albuminem a v menší míře pak CYP3A4. Poločas delamanidu činí 30–38 hodin a je primárně vylučován stolicí.^{35,36} Prodlužuje QT interval a je proto nutné monitorovat pacienta elektrokardiogramem.⁹



Obrázek 10: Delamanid

4.3.2.6. Aminoglykosidy

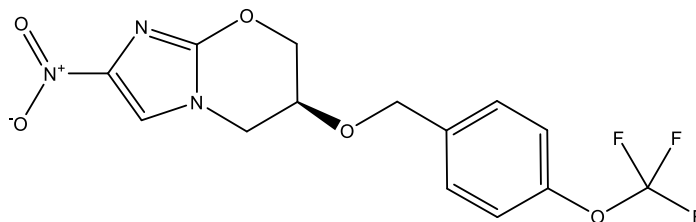
Z aminoglykosidových antibiotik patří do léčiv II. linie amikacin a streptomycin. Jejich mechanismus účinku zahrnuje vazbu na bakteriální 30S ribozomální podjednotku a s tím spojenou inhibici proteosyntézy. Amikacin (Obrázek 11) má špatnou absorpci po perorálním podání. Distribuční objem se pohybuje kolem 28 litrů a je eliminován ledvinami.^{37,38} Streptomycin (Obrázek 11) má taktéž špatnou biodostupnost po perorálním podání. Proto jsou oba léky podávány parenterálně intramuskulárně či intravenózně. Poločas streptomycinu je 2,5 hodin a je eliminován ledvinami. Nežádoucími účinky aminoglykosidů je ototoxicita a nefrotoxicita.^{39,40,41}



Obrázek 11: Amikacin (vlevo) a streptomycin (vpravo)

4.3.2.7. Pretomanid

Pretomanid (Obrázek 12) se podává společně s badachilinem a linezolidem, je určený k léčbě TB, která je rezistentní alespoň na 4 různá antituberkulotika (včetně isoniazidu a rifampicinu), nebo při nemožnosti užití jiných antituberkulotik v důsledku nežádoucích účinků. Jako proléčivo je aktivováno enzymem nitroreduktázou na reaktivní dusíkaté látky, které jsou toxické pro mykobakterie. Dalším mechanismem účinku je inhibice tvorby buněčné stěny.⁴² Biodostupnost je po perorálním podání více než 53 %, absorpce je zvětšená při podání s tučným, vysoce kalorickým jídlem. Pretomanid je extenzivně metabolizován na více než 19 metabolitů skrze různé metabolické cesty, poločas činí 16 hodin. Je eliminován z 53-65 % močí a z 26-38 % stolicí.^{42,43}

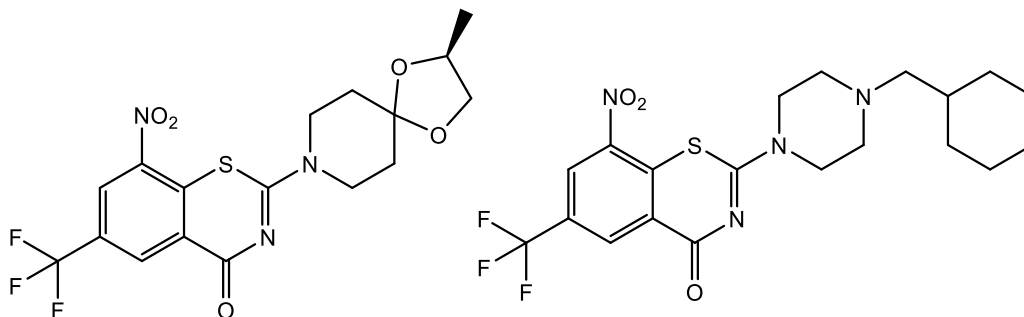


Obrázek 12: Pretomanid

4.3.3. Další potencionální antimykobakteriální látky

4.3.3.1. Benzothiazinony a další DprE1 inhibitory

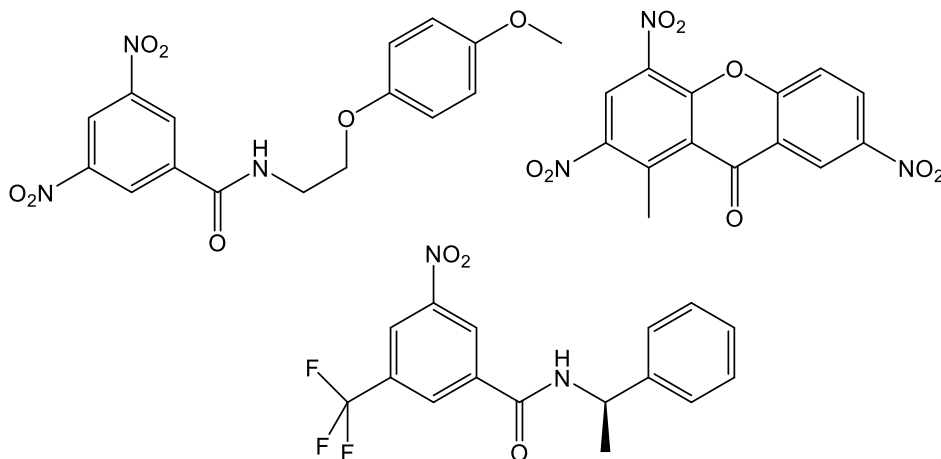
Potencionální nová antituberkulotika jsou benzothiazinony (BTZ043) a jeho piperazinový derivát macozinon (PBTZ-169) (Obrázek 13). Tyto sloučeniny vykazují výbornou antimykobakteriální aktivitu, dosahují hodnot MIC 1,5 ng/ml (BTZ043)⁴⁴ a ≤ 0.19 ng/ml (PBTZ-169)⁴⁵. Jejich mechanismus účinku je založen na ireverzibilní inhibici bakteriální dekaprenylfosforyl- β -D-ribose-2'-epimerázy (DprE1), která je důležitým místem syntézy dekaprenylfosforyl arabinózy, ta je esenciální pro biosyntézu složek buněčné stěny – arabinogalaktanu a lipoarabinomannanu.⁴⁶ I když mají obě látky stejný mechanismus účinku, PBTZ-169 má řadu výhod. PBTZ-169 nemá chirální centra, tedy jeho syntéza, kontrola a výroba je snazší a levnější. Dále vykazuje menší cytotoxicitu a rychlejší absorpci. Inhibuje DprE1 efektivněji než BTZ043, což může být způsobeno lepší flexibilitou cyklohexylmethyl-piperazinového fragmentu na aktivním místě DprE1.⁴⁷ Látky jsou ve stádiu klinického testování.



Obrázek 13: BTZ043 (vlevo) a PBTZ-169 (vpravo)

Jsou známé i další látky inhibující DprE1 – dinitrobenzamid DNB1 a jeho deriváty. Benzothiazinony a dinitrobenzamidy jsou nitroaromatické látky, obsahující elektron odtahující

skupinu (EWG) v pozici meta vůči nitro skupině. Na základě těchto vlastností byli nalezeni, připraveny a otestovány další látky – MTX, CT319, jako potencionální antituberkulotika (Obrázek 14).⁴⁸



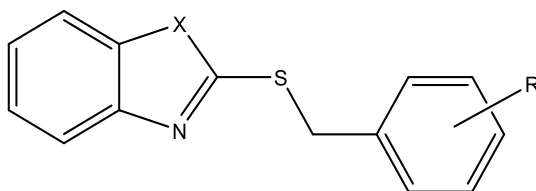
Obrázek 14: DNB1 (vlevo), MTX (vpravo), CT319 (dole)

4.4. Výzkum na FaF UK

Katedra organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy se věnuje vývoji nových potencionálních antituberkulotických látek se zaměřením na substituované dusíkaté heterocykly obsahující ve své struktuře nitroskupinu. Hlavními subjekty výzkumu jsou substituované 1,3,4-oxadiazoly, tetrazoly a jejich analoga, které obsahují 3,5-dinitrofenylový fragment.

4.4.1. Benzazoly

Během studia benzazolů byla objevena antimykobakteriální aktivita sloučenin, kde alkylsulfanylová skupina byla připojená k elektron deficitnímu atomu uhlíku heterocyklu. Na základě těchto výsledků byly připraveny série 2-benzylsulfanylbenzazolů – benzimidazolů, benzoxazolů a benzothiazolů, s různou substitucí na benzylu (Obrázek 15).⁴⁹



Obrázek 15: Substituovaný 2-benzylsulfanylbenzimidazol, -benzoxazol a -benzthiazol
($X = N, O, S$)

R=	MIC vůči <i>M. tuberculosis</i> My 331/88 (μM)		
	Benzimidazol ⁵⁰	Benzthiazol ⁴⁹	Benzoxazol ⁵¹
benzyl	250	250	250
4-nitrobenzyl	62	32	62
3,5-dinitro	4	2	8
2,4-dinitro	4	2	8

Tabulka 2: Antimykobakteriální aktivita 2-benzylsulfanylbenzazolů (uvedeny hodnoty MIC v μM)

Nejlepších antimykobakteriálních aktivit dosahovali ve všech sériích 3,5-dinitro a 2,4-dinitrobenzyl deriváty (Tabulka 2). Dinitro substituované látky se jeví jako nejslibnější, a proto jsme se jim dále věnovali.

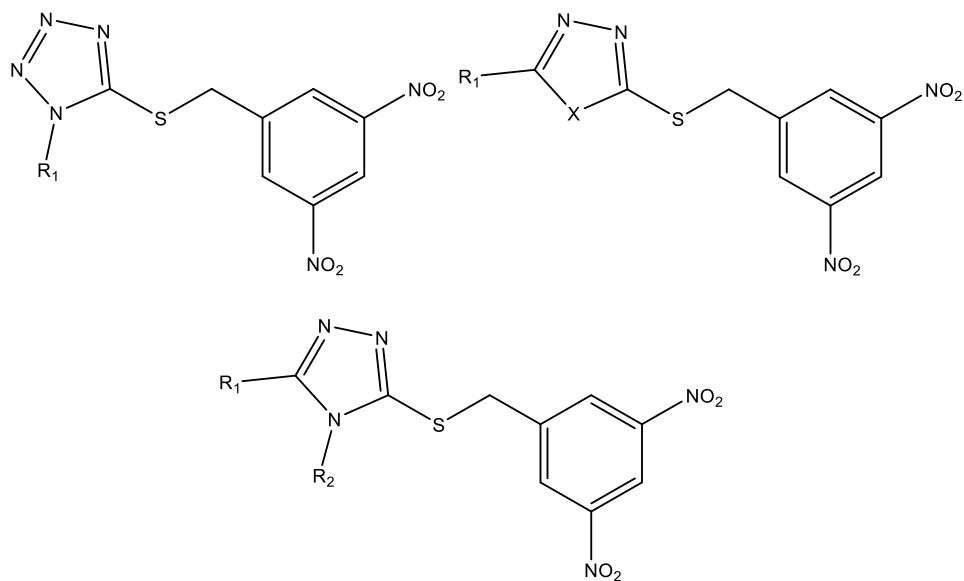
Hlavní nevýhodou substituovaných 2-benzylsulfanylbenzazolů však byla jejich nízká rozpustnost.⁴⁹ Proto se výzkum zaměřil na možnou obměnu heterocyklu benzazolu, s cílem zlepšit ADME vlastnosti a rozpustnost.⁵²

4.4.2. Analoga benzimidazolů s modifikovaným heterocyklem

Za účelem vyvinutí látek s lepší účinností a rozpustností, byly připraveny série látek, kde byl benzimidazolový heterocyklus zaměněn za jiný heterocyklus (Obrázek 16). Obměna benzimidazolu (MIC 4 μM)⁵⁰ za tetrazolový (MIC 1 μM)⁵³ či 1,2,4-triazolový (MIC 1 μM)⁵⁴ cyklus nevedla k výraznému zlepšení aktivity. Ale záměna za 1,3,4-thiadiazolový (MIC 0,03 μM)⁵⁵ nebo 1,3,4-oxadiazolový heterocyklus (MIC 0,03 μM)⁵⁵ byla spojena s výrazně vyšší účinností, a proto můžeme tvrdit, že i heterocyklus přispívá ke zvýšení

antimykobakteriální aktivity. 1,3,4-Oxadiazoly měli lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech a proto byly vybrány pro další studie.

Substituované 1,3,4-oxadiazoly a 1,3,4-thiadiazoly byly dále testovány a ukázalo se, že neovlivňovali růst jiných bakterií ani hub, vykazovali tedy vysokou selektivitu vůči *M. tuberculosis*. Měli také nízkou toxicitu vůči lidským hepatocytům a testy genotoxicity a mutagenity prokázali nízkou mutagenitu těchto látek. Kvůli přítomnosti dvou nitroskupin a strukturní podobností s DNB1, CT319, MTX (Obrázek 14) a benzothiazinony (Obrázek 13) se předpokládalo, že by tyto látky mohly inhibovat DprE1, avšak studie naznačili nový mechanismus účinku zahrnující inhibici mykobakteriálních nukleových kyselin. Nevýhodou těchto látek byla jejich rychlá metabolická degradace a nízká rozpustnost ve vodě.⁵⁵

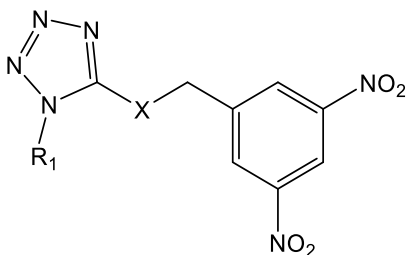


Obrázek 16: Substituovaný tetrazol (R =alkyl, aryl) a 5-substituovaný 2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol, 1,3,4-thiadiazol (R =alkyl, aryl, $X=O,S$) a 3,4-di(alkyl/aryl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-4H-1,2,4-triazol.

4.4.3. Analoga s modifikovaným spojovacím řetězcem a R₁ substitucí

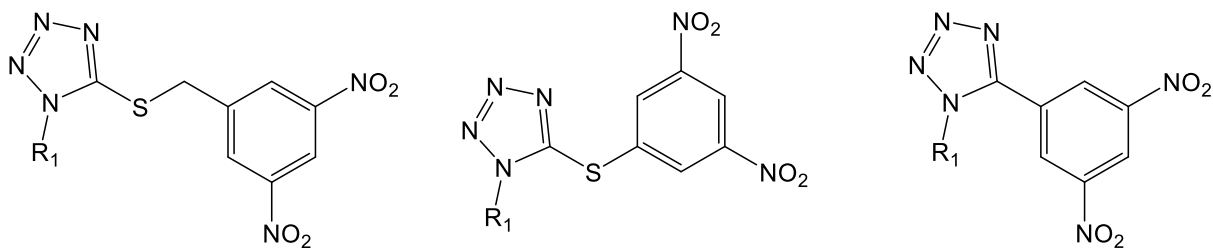
Při výzkumu 1-alkyl/aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1H-tetrazolů byl rovněž zkoumán vliv spojovacího řetězce na antimykobakteriální aktivitu. Byly proto připraveny analoga se sulfanylovým, oxy, selanylovým, sulfoxidovým, a sulfonovým spojovacím řetězcem (Obrázek 17). Isosterní záměna heteroatomu (S, Se, O) neměla významný vliv na aktivitu – látky vykazovaly stejnou aktivitu vůči *M. tuberculosis* a dosahovali MIC 1 μ M.

Oxidace síry vedla ke snížení aktivity z 1-4 μM na 8-62 μM u sulfoxidových derivátů a 2-16 μM u sulfonových derivátů.⁵⁶



Obrázek 17: Tetrazoly s modifikovaným spojovacím řetězcem $X=-O-$, $-S-$, $-Se-$, $-SO-$, $-SO_2-$

K prozkoumání vlivu délky spojovacího řetězce byly připraveny 1-alkyl/aryl-5-(3,5-dinitrofenyl)sulfanyl-1H-tetrazoly, kde byl vynechán methylen ve spojovacím řetězci, a 1-alkyl/aryl-3,5-dinitrofenyl-1H-tetrazoly s 3,5-dinitrofenylový fragmentem přímo napojeným na tetrazolový kruh (Obrázek 18).



Obrázek 18: 1-Alkyl/aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1H-tetrazol (vlevo, předlohová látka), 1-alkyl/aryl-5-(3,5-dinitrofenyl)sulfanyl-1H-tetrazol (uprostřed) a 1-alkyl/aryl-3,5-dinitrofenyl-1H-tetrazol (vpravo)

Ukázalo se, že vynechání methylensulfanylové skupiny u 1-alkyl/aryl-3,5-dinitrofenyl-1H-tetrazolů vedlo ke zvýšení aktivity až na MIC 0,03 μM , ale pouhé zkrácení řetězce o methylenovou skupinu u 1-alkyl/aryl-5-(3,5-dinitrofenyl)sulfanyl-1H-tetrazolů aktivitu významně neovlivňovalo a MIC zůstávala v rozmezí 1-4 μM .⁵³

Za zmínku stojí i vliv R_1 -substituce na antimykobakteriální aktivitu zkoumaných látek. Aktivita výsledných látek byla ovlivněna jejich lipofilitou: snížení lipofility vedlo ke snížení nebo ztrátě aktivity. Methyl a amino deriváty vykazovaly MIC 8 a 4 μM , zatímco 4-chlorfenyl derivát byl účinný s MIC 1 μM . Přítomnost volné karboxylové skupiny vedlo ke kompletní ztrátě aktivity, její esterifikací se antimykobakteriální aktivita obnovila.⁵⁶

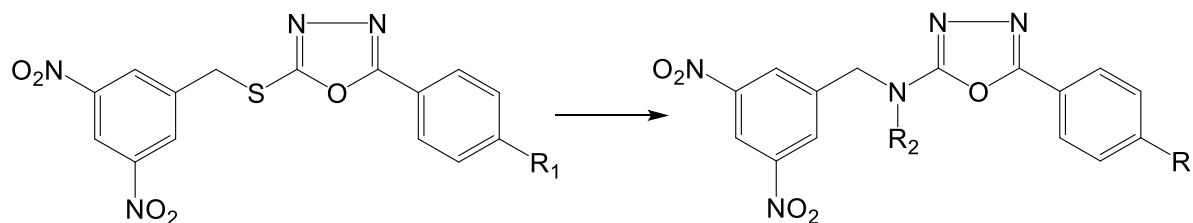
5. CÍL PRÁCE

Tato práce navazuje na výzkum antimykobakteriálně účinných látek prováděný na KOBCH FaF UK. Cílem diplomové práce byla syntéza 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů, optimalizace syntetických postupů a studium vlivu záměny síry v 5-alkyl/aryl-2-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazolů za amino skupinu (Obrázek 19).

Výchozí látkou pro syntézu požadovaných produktů byl (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát. V rámci této diplomové práce byly vyzkoušeno několik syntetických postupů k přípravě této látky: získáním 3,5-dinitrobenzylaminu s následujícím převedením na (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát nebo reakcí 3,5-dinitrobenzylchloridu s thiokyanatanem draselným. Bylo vyzkoušeno několik reakcí pro syntézu 3,5-dinitrobenzylaminu; s cílem najít optimální reakční podmínky byl u reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s thiokyanatanem draselným zkoumán vliv rozpouštědla, teploty a poměru výchozích látek.

Druhým krokem syntézy finálních 1,3,4-oxadiazol-2-aminů byla cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů. K nalezení optimálních podmínek pro vznik 1,3,4-oxadiazol-2-aminů byly v této práci porovnány dvě metody provedení této reakce.

Ke zjištění vlivu náhrady síry za amino skupinu byla u připravených 1,3,4-oxadiazol-2-aminů stanovena jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivita a porovnána s předlohovými látkami.



Obrázek 19: Obecná struktura připravovaných 1,3,4-oxadiazolů v porovnání s původními 1,3,4-oxadiazoly

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

(3,5-Dinitrobenzyl)isothiokyanát je klíčovou výchozí látkou pro syntézu 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů. Proto bylo vyzkoušeno několik postupů k jeho přípravě. Prvním návrhem byla syntéza 3,5-dinitrobenzylaminu s následujícím převedením na (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát pomocí reakce s Et₃N a CS₂. Pro syntézu 3,5-dinitrobenzylaminu byly zvolené redukce 3,5-dinitrobenzamidů nebo 3,5-dinitrobenzylazidů nebo reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s urotropinem s následující hydrolyzou. Druhým návrhem bylo využít již dříve zkoumanou reakci 3,5-dinitrobenzylchloridu s KSCN a vyzkoušet najít optimální reakční podmínky.

Syntéza cílových 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů spočívá v reakci (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu s odpovídajícím hydrazidem. Vzniklé 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidy byly dále zacyklené na odpovídající 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy a to buď v přítomnosti pyridinu a tosylchloridu v THF⁵⁷, anebo pomocí EDC·HCl v DMSO⁵⁸.

6.1. Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu

6.1.1. Syntéza 3,5-dinitrobenzamidů

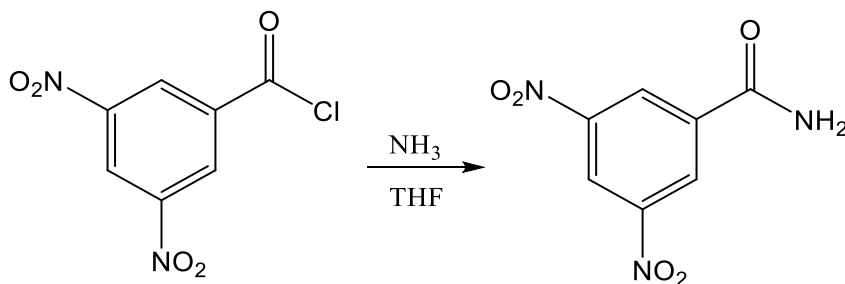


Schéma 1: Příprava 3,5-dinitrobenzamidů

Roztok 3,5-dinitrobenzoylchloridu (1,02 g, 4,34 mmol) v THF (30 ml) byl probublán NH₃ při chlazení v ledové lázni. Reakční směs byla míchaná 30 minut a vzniklý produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku. Dále byl produkt rozpuštěn v EtOAc (30 ml) a extrahován s vodou (2 × 30 ml). Organická vrstva byla oddělena, vysušena pomocí bezvodého Na₂SO₄, přefiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. 3,5-Dinitrobenzamid byl získán v dostačující čistotě a byl použit v dalších reakcích bez dodatečného čištění.

1: 3,5-Dinitrobenzamid

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 211,13 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,92 g

Praktický výtěžek: 0,43 g (47%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) δ 9.05 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 8.95 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.01 (s, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ 163.90, 148.42, 137.23, 127.91, 121.11.

Elementární analýza:

• vypočteno:	C: 39,82	H: 2,39	N: 19,9
• změřeno:	C: 40,04	H: 2,25	N: 19,86

Teplota tání: 180-182 °C (lit. 183 °C)⁵⁹

6.1.2. Redukce 3,5-dinitrobenzamidů

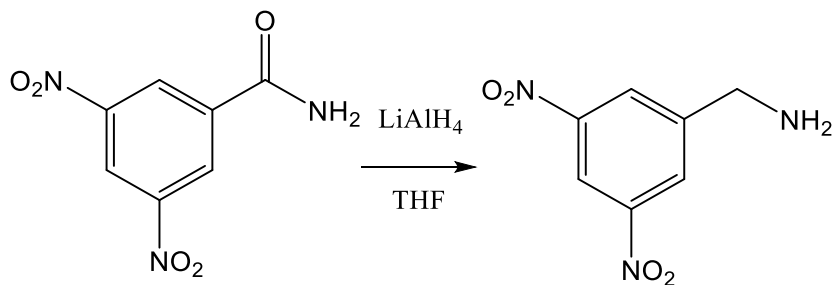


Schéma 2: Příprava 3,5-dinitrobenzylaminu

K roztoku 3,5-dinitrobenzamidů (0,2 g, 0,95 mmol) v THF (15 ml) při chlazení a pod inertní atmosférou (Argon) byl přikapán 1M roztok LiAlH_4 (2 ml, 2 mmol). Reakce byla míchána 12 hodin při pokojové teplotě. Ukončení reakce bylo zkontrolováno pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 1:1) a k reakční směsi byl přidán 10 % roztok NaOH (10 ml). Vzniklý roztok byl rozředěn EtOAc (50 ml) a extrahován vodou (3×30 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a zfiltrována. Byla provedena další kontrola pomocí TLC s jinou mobilní fází (chloroform/methanol, 10:1). TLC ukázalo, že vznikla směs látek s blízkým retenčním faktorem, proto nebylo provedeno čištění a charakterizace látek.

6.1.3. Syntéza 3,5-dinitrobenzylazidu

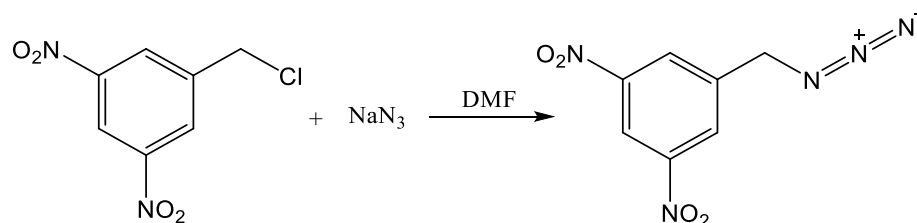


Schéma 3: Příprava 3,5-dinitrobenzylazidu

K roztoku 3,5-dinitrobenzylchloridu (1,05 g, 4,85 mmol) v EtOH (20ml) byl přidán azid sodný (0,49 g, 7,53 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 1 hodinu. Průběh reakce byl zkontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethylacetát, 5:1) a bylo zjištěno, že reakce neprobíhá. Proto bylo rozpouštědlo vyměněno za dimethylformamid (DMF, 10 ml). Po dalším zahříváním při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny byla opět provedena kontrola pomocí TLC. Nyní TLC ukázalo, že reakce proběhla. DMF byl odpařen pomocí vakuové rotační odparky. Odparek byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (30 ml) za vzniku červeného roztoku a posléze extrahován vodou (2 × 50 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a následně bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. Produkt byl získán v dostačující čistotě a byl použit v dalších reakcích bez dodatečného čištění.

2: 3,5-Dinitrobenzylazid

Vzhled: světle hnědá krystalická látka

Molární hmotnost: 223,15 g/mol

Teoretický výtěžek: 1,02 g

Praktický výtěžek: 0,84 g (82 %)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO-*D*6) δ 8.79 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.63 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 4.84 (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ δ (126 MHz, DMSO-*D*6) δ 148.33, 140.70, 128.76, 118.23, 51.80.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 37,68 H: 2,26 N: 31,39

• změřeno: C: 37,72 H: 2,07 N: 31,45

Teplota tání: 50-51 °C (lit. 50-52 °C)⁶⁰

6.1.4. Redukce azidu

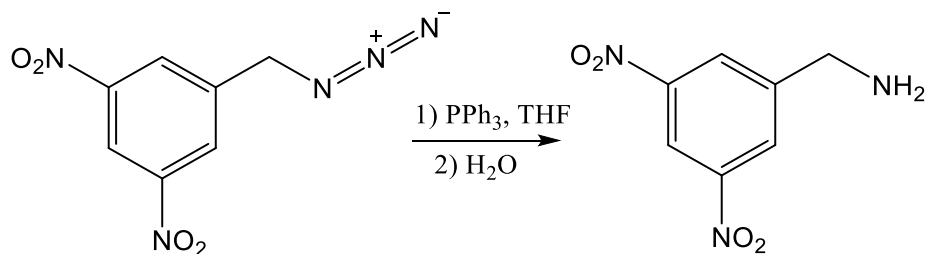


Schéma 4: Příprava 3,5-dinitrobenzylaminu pomocí trifenylofosfinu

K roztoku 3,5-dinitrobenzylazidu (0,70 g, 3,13 mmol, 1 eq.) v THF (30 ml) byl přidán Ph_3P (0,99 g, 3,8 mmol, 1,2 eq.) a reakční směs byla míchána 4 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla do reakční směsi přidána voda (25 ml) a směs byla míchána dalších 48 hodin.⁶¹ Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové rotační odparky. Odparek byl rozpuštěn v EtOAc (60 ml) a extrahována vodou (2×50 ml). Organická vrstva byla zkontrolována pomocí TLC (mobilní fáze: čistý EtOAc, hexan/EtOAc, 5:1 nebo hexan/EtOAc/ Et_3N , 20:10:1). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a následně bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. K izolaci produktu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze: chloroform/methanol 20:1). Produkt byl použit v následující reakci.

3: (3,5-Dinitrobenzyl)amin⁶²

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 197,15 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,62 g

Praktický výtěžek: 0,36 g (58 %)

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.65 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.61 - 8.60 (m, 2H), 3.92 - 3.91 (m, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 150.06, 148.44, 127.94, 116.86, 44.84.

6.1.5. Syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylaminu

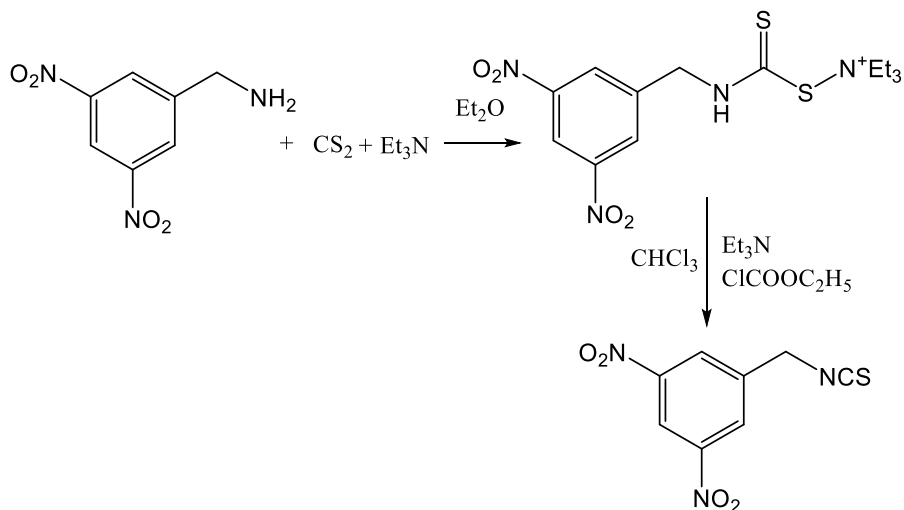


Schéma 5: Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylaminu

K roztoku aminu (0,35 g, 1,8 mmol, 1 eq.) v Et₂O (20 ml) za inertní atmosféry (argon) byl přikapán Et₃N (0,18 g / 0,25 ml, 1,8 mmol, 1 eq.). Reakční směs byla ochlazena na -15°C a byl k ní přikapán sirouhlík (0,137 g / 0,11 ml, 1,8 mmol, 1 eq.). Reakční směs byla míchána za snížené teploty 1 hodinu, dále byla ponechána ohřát na laboratorní teplotu a míchala se dalších 30 minut. Vzniklá sraženina byla odfiltrována za sníženého tlaku.

K suspenzi izolovaného triethylammonium (3,5-dinitrobenzyl)karbamodithioátu v CHCl₃ (20 ml) za inertní atmosféry byl přidán Et₃N (0,19 g / 0,26 ml, 1,9 mmol, 1,03 eq.). Reakční směs byla ochlazena na -25 °C a k ní byl přikapán ethyl chlorformiát (0,20 g / 0,18 ml, 1,9 mmol, 1,03 eq.). Po přidání celého množství ethyl chlorformiátu byla reakční směs míchána za chlazení po dobu 1 hodiny. Po zahřátí na laboratorní teplotu byla míchaná dalších 30 min a vzniklá sraženina byla zfiltrována. Kontrolní TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 4:1) potvrdilo přítomnost produktu ve filtrátu. Filtrát byl přesunut do dělicí nálevky a byl extrahován 1% vodným roztokem HCl (2 × 30 ml). Organická vrstva byla dále promyta vodou (1 × 50 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (1 × 30 ml). Filtrát byl vysušen bezvodým síranem sodným a posléze zfiltrován. Následně bylo použité rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. K izolaci (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát, 10:1. Látka byla charakterizována pomocí NMR (str. 38-39, kapitola 6.1.8). Výtěžek (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byl 56 mg (13 %).

6.1.6. Syntéza a hydrolýza 1-(3,5-dinitrobenzyl)tetraazaadamantan-1-ium chloridu

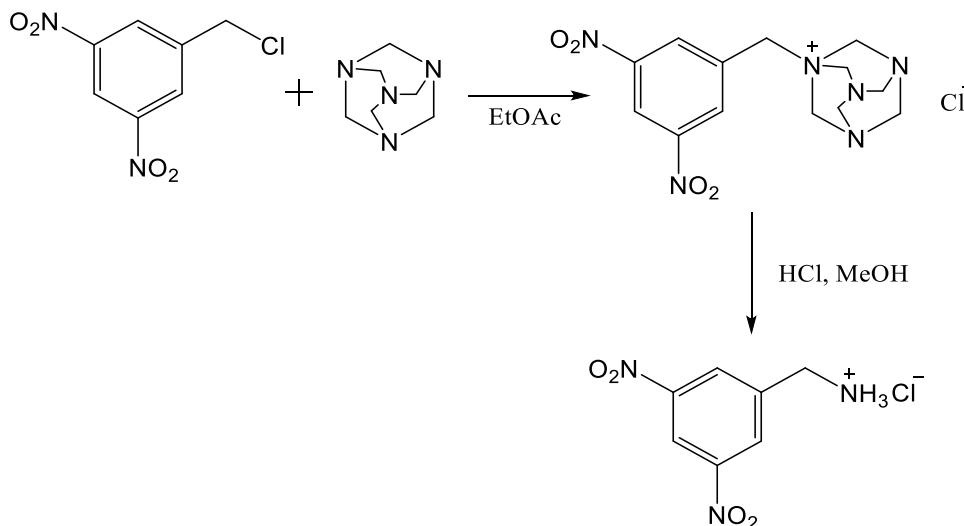


Schéma 6: Příprava a následná hydrolýza 1-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,5,7-tetraazaadamantan-1-ium chloridu

K roztoku 3,5-dinitrobenzylchloridu (3,03 g, 13,99 mmol, 1 eq.) v ethyl-acetátu (50 ml) byl přidán urotropin (2,14 g, 15,24 mmol, 1,1 eq.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 54 hodin. Po kontrolní TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 3:1) bylo zjištěno, že reakce neproběhla kompletně, proto bylo rozhodnuto zahřívát reakční směs k varu po dobu 8 hodin. Po ukončení zahřívání a ochlazení vznikla sraženina. Sraženina byla zfiltrována za sníženého tlaku. Výtěžek reakce byl 4,61 g (92 %). Suspenze izolovaného 1-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,5,7-tetraazaadamantan-1-ium chloridu (4,61 g) a koncentrované kyseliny chlorovodíkové (2,5 ml) v methanolu (50 ml) byla zahřívána k varu po dobu 4 hodin. Dále byla reakční směs zahuštěna za sníženého tlaku. K surovému produktu byl přidán Et₂O (30 ml) a produkt byl odfiltrován. 3,5-Dinitrobenzylammonium chlorid jako směs s chloridem amonným byl použit v další reakci.

3,5-dinitrobenzylamonium chloridu

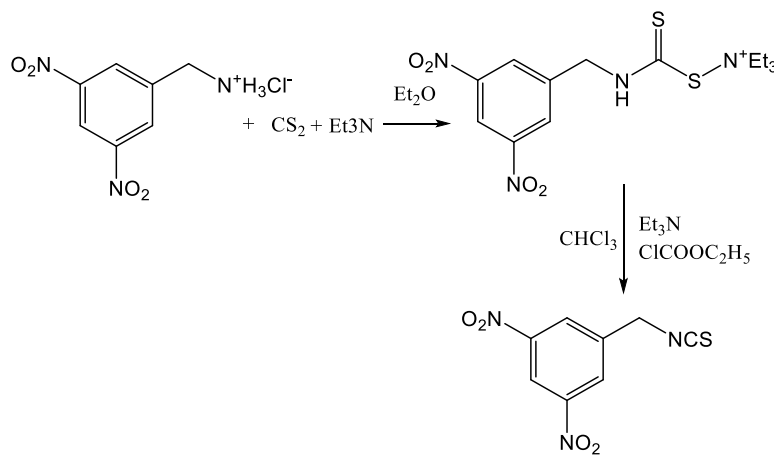


Schéma 7: Příprava 3,5-dinitrobenzylisothiokyanátu z hydrochloridu 3,5 dinitrobenzylaminu

K suspenzi hydrochloridu (3,76 g, 16,12 mmol, 1eq.) v Et₂O (50ml) za inertní atmosféry (argon) byl přikapán Et₃N (3,32 g / 4,6 ml, 32,24 mmol, 2 eq.). Reakční směs byla ochlazena na -15°C a byl k ní přikapán sirouhlík (1,23 g, 16,15 mmol, 1eq.). Reakční směs byla míchána za snížené teploty 1 hodinu, dále byla ohřáta na laboratorní teplotu a míchaná dalších 30 minut. Vzniklá sraženina byla odfiltrována za sníženého tlaku.

Izolovaný triethylammonium (3,5-dinitrobenzyl)karbamodithioát (6,02 g, 16,12 mmol) byl rozmíchán v CHCl₃ (100 ml) a k vzniklé suspenzi za inertní atmosféry byl přidán Et₃N (1,67 g / 2,3 ml, 16,50 mmol, 1,03eq.). Reakční směs byla ochlazena na -25 °C a k ní byl přikapán ethyl chlorformiát (1,76 g / 1,54 ml, 16,22 mmol, 1,03eq.). Po přidání celého množství ethyl chlorformiátu byla reakční směs míchána za chlazení po dobu 1 hodiny. Byl pozorován vznik sraženiny a změna barvy roztoku. Po zahřátí na laboratorní teplotu byla suspenze zfiltrována. Kontrolní TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát, 4:1) potvrdilo přítomnost produktu ve filtrátu. Filtrát byl přesunut do dělicí nálevky a byl extrahován 1% vodným roztokem HCl (2 × 200 ml). Organická vrstva byla dále promyta vodou (1 × 100 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (1 × 100 ml). Filtrát byl vysušen bezvodým síranem sodným a posléze zfiltrován. Následně bylo použité rozpouštědlo odpařeno na vakuové rotační odparce. K izolaci (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát, 10:1). Výtěžek (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byl 0,3 g (8 %). Látka byla charakterizována pomocí NMR (str. 38-39, kapitola 6.1.8).

6.1.8. Syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylchloridu

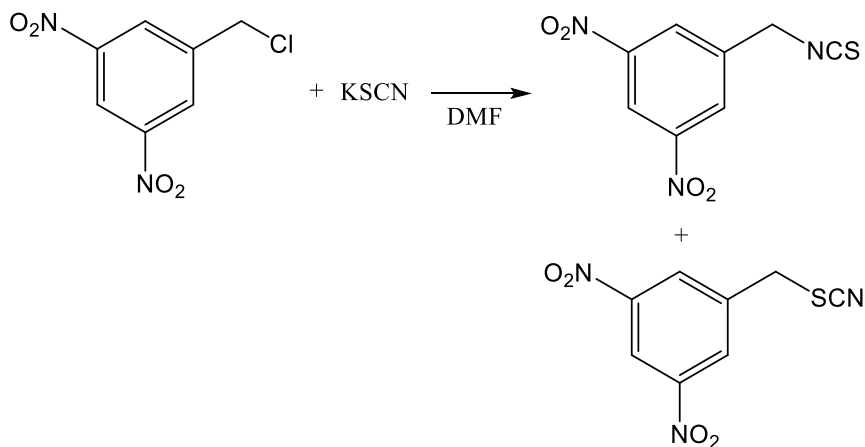


Schéma 8: Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu

K roztoku 3,5-dinitrobenzylchloridu (3,02 g, 13,44 mmol, 1eq.) v DMF (20 ml) byl za laboratorní teploty přisypán KSCN (1,57 g, 16,19 mmol, 1,2 eq.) a reakční směs byla zahřívána na 130 °C 4 hodiny. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát, 4:1). Po ukončení reakce byl DMF odpařen na vakuové rotační odparce. Následně byl odparek rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a extrahován vodou (2 × 50 ml) a roztokem chloridu sodného (1 × 30 ml). Organická vrstva byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného a zfiltrována. TLC ukázalo přítomnost dvou produktů – (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu a (3,5-dinitrobenzyl)thiokyanátu. K separaci produktů ze směsi byla využita sloupcová chromatografie (mobilní fáze hexan/ethylacetát, 10:1).

4: (3,5-Dinitrobenzyl)isothiokyanát

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 239,21 g/mol

Teoretický výtěžek: 3,33 g

Praktický výtěžek: 0,94 g (28 %)

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.77 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 5.22 (s, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 148.76, 139.48, 131.67, 128.60, 118.88, 47.32.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 40,17 H: 2,11 N: 17,57 S: 13,40

• změřeno: C: 40,38 H: 2,01 N: 17,56 S: 13,72

Teplota tání: 105 - 107 °C (lit. 107 - 108 °C)⁶²

5: (3,5-Dinitrobenzyl)thiokyanát

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 239,21 g/mol

Teoretický výtěžek: 3,33 g

Praktický výtěžek: 1,78 g (53 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.81 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 4.64 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 148.36, 141.29, 129.74, 118.65, 112.73, 35.09.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 40,17 H: 2,11 N: 17,57 S: 13,40

• změřeno: C: 40,38 H: 2,25 N: 17,56 S: 13,72

Teplota tání: 118 – 120 °C (lit. 120 – 121 °C)⁶²

6.1.9. Optimalizace reakčních podmínek reakce 3,5-dinitrobenzyl chloridu s KSCN

(3,5-Dinitrobenzyl)isothiokyanát je klíčová látka pro syntézu finálních látek. Z tohoto důvodu a nutnosti připravit větší množství výchozí látky bylo rozhodnuto se pokusit optimalizovat reakční podmínky reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s thiokyanatanem draselným. Pokusy o optimalizaci reakčních podmínek byly již prováděny dříve, při použití DMSO, THF, acetonu a směsi DMF s vodou jako rozpouštědel vnikal pouze 3,5-dinitrobenzylthiokyanát. Při záměně thiokyanatanu draselného za thiokyanatan stříbrný vznikala rovněž pouze thiokyanát. Pro přípravu (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu se jevil DMF jako rozpouštědlo při teplotě 130 °C nejvhodnější.⁶⁰ Pro rozvinutí této práce byly proto

vyzkoušena další rozpouštědla a teplotní podmínky, které nebyly ještě popsány. Souhrn užitých rozpouštědel, reakčních podmínek a výtěžnost reakcí uveden v tabulce 3.

Rozpouštědlo	Výtěžek 3,5-dinitrobenzyl isothiokyanátu (%)	Výtěžek 3,5-dinitrobenzyl thiokyanátu (%)
1,2 eq. KSCN, acetonitril, reflux, 2,5h	0 %	69 %
1,2 eq. KSCN, ethanol, reflux, 6h	0 %	81 %
1,2 eq. KSCN, toluen, reflux, 26h	Reakce probíhala zanedbatelně	
1,2 eq. KSCN, CH ₂ Cl ₂ , reflux, 25h	Reakce probíhala zanedbatelně	
1,2 eq. KSCN, DMSO, 110 °C, 6h	17 %	0 %
1,2 eq. KSCN, THF, reflux, 5h	0 %	77 %

Tabulka 3: Provedené pokusy o optimalizaci syntézy (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu

Jako poslední byl změněn molární poměr 3,5-dinitrobenzylchloridu a thiokyanatanu draselného. Bylo zvoleno zvýšit poměr thiokyanatanu z 1,2 molárních ekvivalentů na 2,0 molárních ekvivalentů. Při zvětšeném poměru thiokyanatanu draselného nebyl pozorován vliv na výtěžek.

Při prováděných reakcí v DMF byl taktéž pozorován velký vliv reakční teploty. Nejlepší výtěžnost měli reakce, kde byl thiokyanatan draselný přidán do vyhřátého na 130 °C roztoku benzylchloridu v DMF. Při pomalém zahřívání na reakční teplotu (130 °C) vznikal větší podíl 3,5-dinitrothiokyanatanu.

6.2. Syntéza 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů

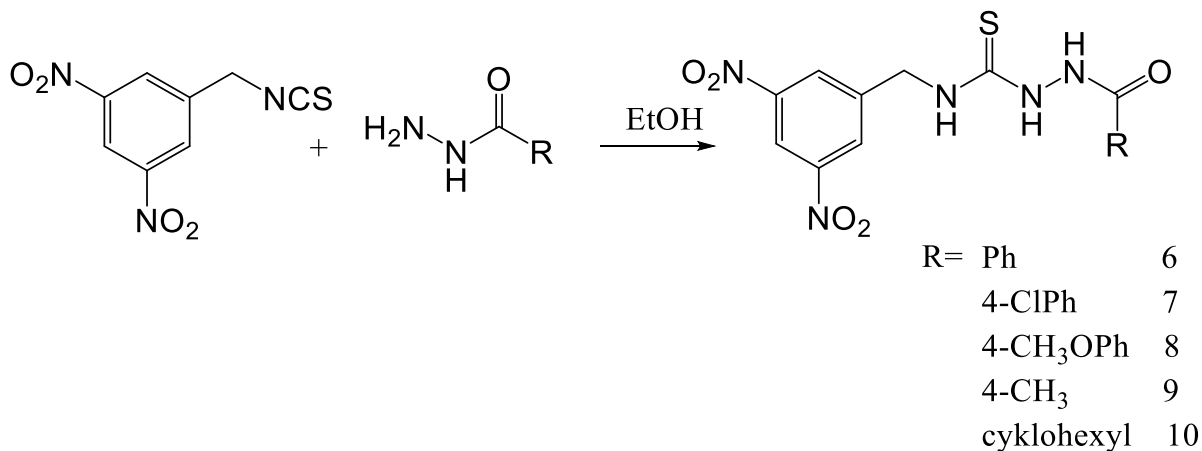


Schéma 9: Příprava 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidu

K suspenzi (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu (1 eq.) v EtOH (15 ml) byl přidán odpovídající acylhydrazid (1 eq.). Reakční směs byla zahřívána k varu po dobu 13-15 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát, 3:1). Reakční směs byla po vychladnutí zfiltrována, produkt na filtru byl promyt malým množstvím ethanolu. Produkt byl získán v dostačující čistotě a byl použit do další reakce bez čištění.

6.2.1. Charakterizace látek

6: 1-Benzoyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 375,35 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,39 g

Praktický výtěžek: 0,32 g (82 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 10.54 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.72 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.97 - 7.92 (m, 2H), 7.62 - 7.57 (m, 1H), 7.52 - 7.49 (m, 2H), 4.93 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 181.35, 166.07, 148.04, 144.61, 132.45, 132.16, 128.49, 128.00, 127.78, 117.18, 45.96.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 48,00 H: 3,49 N: 18,66 S: 8,54

• změřeno: C: 47,80 H: 3,32 N: 18,84 S: 8,35

Teplota tání: 196-198 °C

7: 1-(4-Chlorbenzoyl)-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 409,80 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,43 g

Praktický výtěžek: 0,35 g (81 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 10.63 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.72 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.93 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 182.65, 165.17, 148.05, 144.54, 137.00, 131.27, 129.92, 128.62, 127.73, 117.19, 45.93.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 43,96 H: 2,95 N: 17,09 S: 7,82

• změřeno: C: 43,91 H: 2,84 N: 17,33 S: 7,73

Teplota tání: 194-196 °C

8: 1-(4-Methoxybenzoyl)-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 405,39 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,96 g

Praktický výtěžek: 0,72 g (75 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 10.39 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.72 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.92 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 182.71, 165.64, 162.34, 148.04, 144.66, 129.94, 127.81, 124.66, 117.17, 113.73, 55.62, 45.95.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 47,41 H: 3,73 N: 17,28 S: 7,91

• změřeno: C: 47,38 H: 3,53 N: 17,46 S: 8,03

Teplota tání: 239 - 241 °C

9: 1-(4-Methylbenzoyl)-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 389,39 g/mol

Teoretický výtěžek: 3,25 g

Praktický výtěžek: 2,80 (86 %)

^1H NMR (600 MHz, DMSO-*D*6) δ 10.42 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.69 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.5$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.89 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.33 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*D*6) δ 183.04, 166.40, 148.41, 145.01, 142.55, 130.07, 129.36, 128.40, 128.17, 117.54, 46.32, 21.57.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 49,35 H: 3,88 N: 17,99 S: 8,23

• změřeno: C: 49,37 H: 3,78 N: 18,31 S: 8,48

Teplota tání: 224 - 226 °C

10: 1-(Cyklohexylkarbonyl)-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 381,41 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,91 g

Praktický výtěžek: 0,50 g (55 %)

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*D*6) δ 9.77 (s, 1H), 9.47 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.71 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 4.90 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.17 (tt, $J = 11.6, 3.5$ Hz, 1H), 1.80 – 1.72 (m, 5H), 1.39 – 1.26 (m, 2H), 1.25 – 1.05 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ 181.62, 175.15, 148.06, 143.84, 127.71, 117.17, 45.89, 42.23, 28.90, 25.58, 25.36

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 47,24 H: 5,02 N: 18,36 S: 8,41

• změřeno: C: 47,26 H: 4,85 N: 18,49 S: 8,29

Teplota tání: 195 – 196 °C

6.3. Syntéza 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů

6.3.1. Metoda A – pomocí pyridinu a tosylchloridu v THF

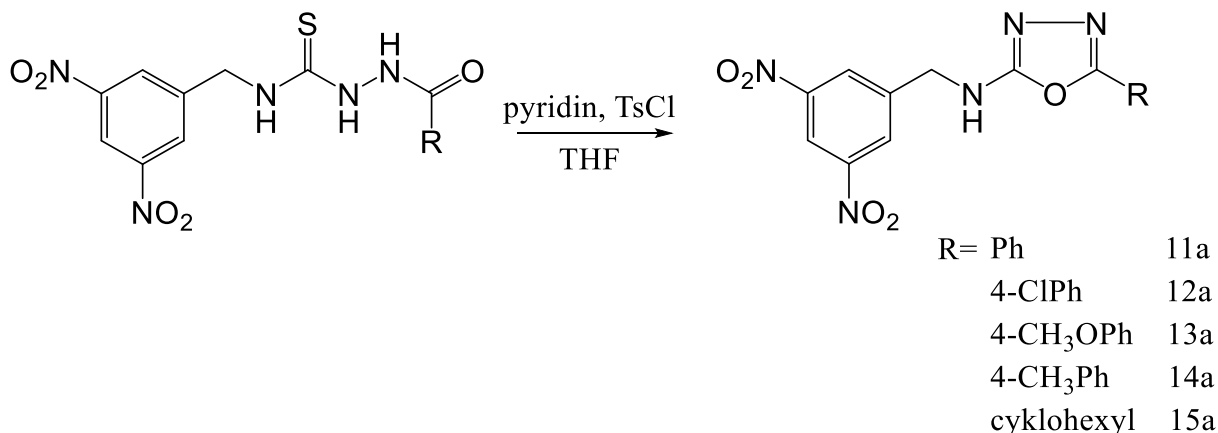


Schéma 10: Cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů na 5-aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy pomocí pyridinu, TsCl v THF

K roztoku 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidu (1 eq.) a pyridinu (2,1 eq.) v suchém THF (35 ml) byl přidán tosylchlorid (2,1 eq.). Reakční směs byla zahřívána k varu po dobu 25-50 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 2:1, posléze 1:2). I přes dlouhodobé ohřívání reakce neproběhla kompletně. Reakční směs byla po vychladnutí zfiltrována za sníženého tlaku. Pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát/triethylamin, 25:50:1) bylo zjištěno, že sraženina na filtru je výchozí látka, zatímco ve filtrátu byl produkt reakce. Filtrát byl odpařen na vakuové rotační odpare. Odparek byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a byla provedena extrakce 5 % uhličitánem sodným (1 × 25 ml) a vodou (1 × 25 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a odpařena na vakuové rotační odpare. K přečištění produktu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát/kyselina octová 10:20:1).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 163.41, 158.38, 148.23, 143.74, 130.84, 129.41, 128.08, 125.42, 124.21, 117.64, 45.05.

Elementární analýza:

- vypočteno: C: 52,79 H: 3,25 N: 20,52
- změřeno: C: 52,41 H: 3,20 N: 20,13

Teplota tání: 201-202 °C

12a, 12b: 5-(4-Chlorfenyl)-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 375,73 g/mol

Teoretický výtěžek: Metoda A: 0,57 g Metoda B: 0,2 g

Praktický výtěžek: Metoda A: 0,34 g (60 %) Metoda B: 0,1 g (50 %)

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.73 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.72 – 8.67 (m, 3H), 7.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.73 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz DMSO-*D*₆) δ 163.78, 157.90, 148.51, 143.95, 135.72, 129.85, 128.38, 127.46, 123.35, 117.94, 45.32.

Elementární analýza:

- vypočteno: C: 47,95 H: 2,68 N: 18,64
- změřeno: C: 47,57 H: 2,69 N: 18,25

Teplota tání: 228 – 230 °C

13a, 13b: *N*-(3,5-Dinitrobenzyl)-5-(4-methoxyfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 371,31 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,6 g Metoda B: 0,21 g

Praktický výtěžek: 0,29 g (49 %) Metoda B: 0,14 g (67 %)

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.73 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.69 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 8.60 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.71 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 163.06, 161.21, 158.33, 148.20, 143.85, 128.06, 127.20, 117.59, 116.70, 114.84, 55.56, 45.05.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 51,76 H: 3,53 N: 18,86

• změřeno: C: 51,59 H: 3,31 N: 18,64

teplota tání: 199 – 201 °C

14a, 14b: *N*-(3,5-Dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 355,31 g/mol

Teoretický výtěžek: 1,19 g

Metoda B: 0,2 g

Praktický výtěžek: 0,36 g (30 %)

Metoda B: 0,17 g (85 %)

^1H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.70 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 8.56 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.68 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 163.58, 158.85, 148.60, 144.14, 141.17, 130.32, 128.46, 125.79, 121.86, 118.00, 45.42, 21.55.

Elementární analýza:

• vypočteno: C: 54,09 H: 3,69 N: 19,71

• změřeno: C: 53,84 H: 3,41 N: 19,95

Teplota tání: 228 – 230 °C

15a, 15b: 5-Cyklohexyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 347,33 g/mol

Teoretický výtěžek: Metoda A: 0,2 g

Metoda B: 0,15 g

Praktický výtěžek: Metoda A: směs výchozí látky a produktu
Metoda B: 0,1 g (67 %)

^1H NMR (600 MHz, DMSO- D_6) δ 8.70 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.60 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 8.20 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.58 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.70 (tt, $J = 11.0, 3.7$ Hz, 1H), 1.87 – 1.66 (m, 5H), 1.58 – 1.35 (m, 2H), 1.29 – 1.19 (m, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- D_6) δ 163.80, 163.39, 148.57, 144.32, 128.44, 117.95, 45.44, 34.63, 30.08, 25.77, 25.23.

Elementární analýza:

- vypočteno: C: 51.87 H: 4.93 N: 20.16
- změřeno: C: 51.62 H: 4.72 N: 20.35

Poznámka: výchozí látka a produkt mají stejný retenční faktor na TLC. Proto je nutné kontrolovat průběh reakce pomocí TCL-MC.

6.4. Alkylace *N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu

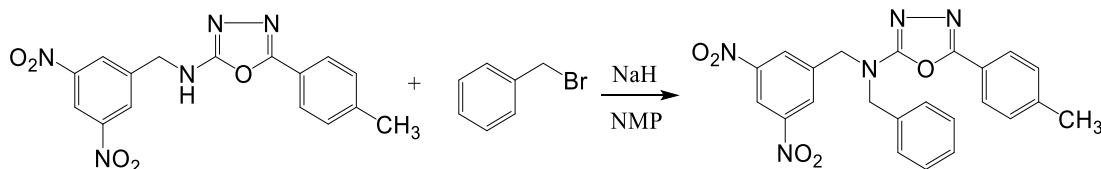


Schéma 12: Alkylace *N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu

K roztoku *N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu (**14b**) (0,15g 0,41 mmol, 1 eq.) v NMP (3 ml) byl přidán hydrid sodný (12 mg, 0,49 mmol, 1,2 eq.), dále byl přikapán benzylbromid (84 mg, 0,49 mmol, 1,2 eq.). Reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze: hexan/ethyl-acetát 1:1). Po proběhnutí reakce byla reakční směs rozředěna ethyl-acetátem (30 ml) a extrahována vodou (2 × 30 ml). Následně byla vodná fáze extrahována ethyl-acetátem (1 × 30 ml), spojené organické fáze byly posléze extrahovány vodou (2 × 30 ml) a nasyceným roztokem NaCl (1 × 20 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, zfiltrována a odpařena na vakuové rotační odparce. K přečištění produktu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 3:2).

16: *N*-Benzyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 445,44 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,18 g

Praktický výtěžek: 0,02 g (11 %)

^1H NMR (600 MHz, DMSO-*D*6) δ 8.67 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.35 – 7.32 (m, 2H), 7.30 – 7.28 (m, 4H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.79 (s, 2H), 2.37 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*D*6) δ 164.32, 159.25, 148.53, 142.33, 141.29, 137.25, 130.29, 129.18, 129.05, 128.59, 128.26, 125.89, 121.78, 118.18, 53.47, 51.72, 21.57.

Elementární analýza:

- | | | | |
|--------------|----------|---------|----------|
| • vypočteno: | C: 62.02 | H: 4.30 | N: 15.72 |
| • změřeno: | C: 61.04 | H: 4.62 | N: 16.70 |

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1. Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu

(3,5-Dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) je klíčovou látkou pro syntézu potřebných thiosemikarbazidů (6-10) a tím i finálních 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů. Nejprve byla vyzkoušena syntéza (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu (4) reakcí 3,5-dinitrobenzylchloridu s thiokyanatanem draselným (6.1.8) v prostředí DMF za teploty 130°C. Při provedení této reakce byl thiokyanatan draselný přidán k roztoku 3,5-dinitrobenzylchloridu v DMF za laboratorní teploty a reakční směs byla zahřívána na požadovanou teplotu. Výhodou této metody byl krátký reakční čas (4 hodiny). Nevýhodou této reakce byla její malá výtěžnost (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu (4) (28 %) a nutnost přečištění produktu sloupcovou chromatografií od vnikajícího 3,5-dinitrobenzylthiokyanatanu. Proto jsme se (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) pokusili připravit různými cestami.

Jedním z návrhů přípravy (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byla reakce 3,5-dinitrobenzylaminu se sirouhlíkem a triethylaminem. Pro přípravu 3,5-dinitrobenzylaminu bylo vyzkoušeno několik reakcí. Reakcí 3,5-dinitrobenzoylchloridu s amoniakem se podařilo získat 3,5-dinitrobenzamid v 47% výtěžku (6.1.1), který byl následně podroben redukcí s tetrahydridohlitanem lithným (1.2). Avšak vznikala směs látek, které se nepodařilo pomocí sloupcové chromatografie oddělit. Další možností byla syntéza 3,5-dinitrobenzylazidu (2) (6.1.3.), který byl získán v 82% výtěžku, a jeho reakce trifenylofosfinem a vodou (6.1.4.) na výsledný 3,5-dinitrobenzylamin s 58% výtěžkem. 3,5-Dinitrobenzylamin byl ihned převeden reakcí se sirouhlíkem a triethylaminem (6.1.5) na výsledný (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4), nicméně výtěžnost této reakce byla velmi nízká (13 %). Poslední navrženou reakcí byla reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s urotropinem a následnou hydrolyzou vznikající látky v kyselém prostředí za vzniku 3,5-dinitrobenzylamonium chloridu (6.1.6). Výsledkem reakce byl hydrochlorid 3,5-dinitrobenzylaminu, který ale byl izolován jako směs s chloridem amonným. Směs obsahující hydrochlorid 3,5-dinitrobenzylaminu byla podrobena reakci s triethylaminem a sirouhlíkem a byl získán požadovaný (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát ve 9% výtěžku (6.1.7).

I když se podařilo získat (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) alternativními způsoby, tak byly tyto přípravy časově i technicky náročnější, zároveň konverze na (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) měla velmi malý výtěžek – 5 % a 9 %, zatímco reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s thiokyanatanem draselným (6.1.8) měla výtěžek 28 %. Proto nejsou navržené reakce (6.1.1 – 6.1.7) vhodné pro přípravu většího množství (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu (4).

Bylo rozhodnuto pokračovat vyzkoušenou reakcí 3,5-dinitrobenzylchloridem s thiokyanatanem draselným (6.1.8) a změnit reakční podmínky. Byli použita různá rozpouštědla – acetonitril, ethanol, toluen, dichlormethan, THF, která nebyla ještě popsána v předešlých výzkumech (viz tabulka 3 v 6.1.9). Produktem reakcí provedených v acetonitrilu, ethanolu a tetrahydrofuranu byl 3,5-dinitrobenzylthiokyanát (5), ale požadovaný (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) nevznikal. Reakce provedené v toluenu a dichlormethanu probíhaly zanedbatelně. Reakce 3,5-dinitrobenzylchloridem s thiokyanatanem draselným v DMSO vedla ke vzniku (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu (4) ve výtěžku 17 %. Proto se vrátilo k DMF jako rozpouštědlu a během těchto reakcí byl pozorován velký vliv reakční teploty na konečný výtěžek: k dosažení největšího výtěžku je nutné přidat thiokyanatan draselný do roztoku 3,5-dinitrobenzylchloridu v DMF, který byl předem zahřát na 130°C.

7.2. Syntéza 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbamidů

V reakcích 6.2. byl připravený (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát (4) podroben reakci s příslušným acylhydrazidem a převeden tak na 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid (6-10). Tyto reakce byly poměrně rychlé (13-15 hodin) a výsledný produkt bylo snadné získat filtrací a promytím ethanolom v dostatečné čistotě. Proto jsme se dále těmito reakcím nevěnovali. Výtěžnost reakcí byla 55-86 %.

7.3. Syntéza 5-alkyl/aryl-N-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů

Během reakcí 6.3. byly připravené 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidy (6-10) převedeny na příslušné 5-alkyl/aryl-N-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (11-15). Při reakčních podmínkách metody A (6.3.1., 11a-15a), kde 1-acyl-4-(3,5-

dinitrobenzyl)thiosemikarbazid reagoval s tosylchloridem za přítomnosti pyridinu v THF⁵⁷, se objevilo několik nedostatků této metody. Reakční čas byl u některých thiosemikarbazidů velmi dlouhý – až 50 hodin, látky byly i po přečištění pomocí sloupcové chromatografie nedostatečně čisté, obsahovaly zbytky tosylchloridu, kyseliny octové nebo výchozí látky. Výtěžnost reakcí byla 30-60 %. 5-Cyklohexyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**15a**) nebylo možné za těchto podmínek získat v dostatečné čistotě, reakce neproběhla kompletně a v reakční směsi zůstal i výchozí 1-(cyklohexylkarbonyl)-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazid (**10**), který měl stejný retenční čas k produktu.

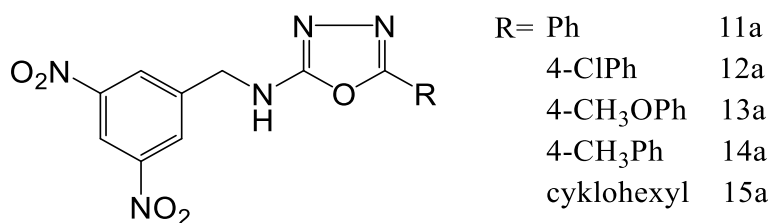
Další metodou pro syntézu 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů (**11-15**) byla cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů (**6-10**) za přítomnosti EDC·HCl v DMSO (Metoda B, 6.3.2).⁵⁸ Tyto podmínky se jeví jako optimální pro syntézu 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů. Reakce měli kratší reakční čas (maximum 30 hodin) a vyšší výtěžek (50-85 %). Navíc nebylo nutné látky přečišťovat sloupcovou chromatografií, látky byly dostatečně čisté po promytí diethyletherem, za těchto podmínek se také podařilo připravit 5-cyklohexyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**15b**, výtěžek 67 %) v dostatečné čistotě.

7.4. Alkylace 5-(4-chlorfenyl)-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu

N-(3,5-Dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**14**) byl zvolen jako základ pro další alkylace z důvodu nejvyšší antimykobakteriální aktivity (viz kap. 7.5). Bylo vyzkoušeno několik alkylačních reakcí: reakce *N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu (**14**) s propyl bromidem, 2-(*boc*-amino)ethyl bromidem a benzyl bromidem za přítomnosti hydridu sodného v NMP. Avšak jenom *N*-benzyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu byl izolován v dostatečné čistotě a ve výtěžku 11% (**16**, 6.4.). U ostatních provedených alkylací bylo po provedení sloupcové chromatografie získáno malé množství nečistého produktu.

7.5. Výsledky antimykobakteriální účinnosti

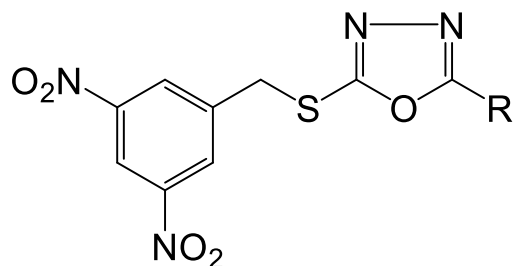
Finální látky byly odeslány na stanovení jejich *in vitro* antimykobakteriální účinnosti. K testování byly vybrány kmeny *M. tuberculosis* My 331/88, *M. avium* My 330/88 a *M. kansasii* My 235/80 a 6509/96. Antimykobakteriální aktivita je udávána jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) v $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V tabulce 4 jsou shrnuty MIC finálních látek a isoniazid. V tabulce 5 jsou pak uvedeny předloňové látky, kde spojovací řetězec obsahuje místo dusíku síru.⁵⁵



Obrázek 20: Přehled finálních látek

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88 14 / 21 dnů	<i>M. avium</i> My 330/88 14 / 21 dnů	<i>M. kansasii</i> My 235/80 7 / 14 / 21 dnů	<i>M. kansasii</i> 6509/96 7 / 14 / 21 dnů
11 (R = Ph)	0,5 / 1	500 / 500	2 / 4 / 8	-
12 (R = 4-ClPh)	1 / 1	4 / 8	1 / 2 / 4	1 / 1 / 2
13 (R = 4-CH ₃ OPh)	0,125 / 0,25	>1000 / >1000	0,5 / 1 / 2	-
14 (R = 4-CH ₃ Ph)	0,06 / 0,125	250 / 250	-	2 / 4 / 8
15 (R = cyklohexyl)	2 / 4	>1000 / >1000	0,5 / 1 / 2	-
Isoniazid⁵⁵	0,5 / 1	>250 / >250	>250 / >250 / >250	4 / 4 / 4

Tabulka 4: Antimykobakteriální aktivita finálních látek (uvedeny hodnoty MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$)



Obrázek 21: Struktura předlohových látek

	M. tuberculosis My 331/88	M. avium My 330/88	M. kansasii My 235/80	M. kansasii 6509/96
	14 / 21 dní	14 / 21 dní	7 / 14 / 21 dní	7 / 14 / 21 dní
R = Ph	0,06 / 0,06	16 / 32	0,5 / 1 / 1	0,5 / 1 / 2
R= 4-ClPh	0,125 / 0,125	>125 / >125	0,125 / 0,25 / 0,25	0,125 / 0,25 / 0,5
R= 4-CH₃OPh	0,125 / 0,125	16 / 32	0,125 / 0,25 / 0,25	0,125 / 0,25 / 0,5
R= 4-CH₃Ph	≤0,03 / ≤0,03	8 / 16	0,06 / 0,06 / 0,06	0,06 / 0,06 / 0,125
R= cyklohexyl	≤0,03 / ≤0,03	neurčeno	0,06 / 0,125 / 0,25	0,06 / 0,25 / 0,25

Tabulka 5: Antimykobakteriální aktivita předlohových látek (uvedeny hodnoty MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$)⁵⁵

Připravené 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (**11-15**) si zachovaly antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* porovnatelnou s předlohovými strukturami. Lze si však všimnout, že jejich účinnost je ovlivněna substituentem v poloze 5. 4-Methylfenylový a 4-methoxyfenylový deriváty vykazovaly nejvyšší aktivitu. Fenylový derivát byl účinnější než 4-chlorfenylový analog a sloučenina nesoucí cyklohexyl byla nejméně aktivní. Nově připravené látky byly výrazně méně aktivní vůči *M. avium* a *M. kansasii*

5-Alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy však zůstávají zajímavým předmětem dalšího výzkumu, protože alkylace na dusíku by mohla vést k látkám se zlepšenou rozpustností v organických rozpouštědlech a ve vodě.

8. ZÁVĚR

Cílem této práce byla syntéza 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů. Tento výzkum navazuje na studium antituberkuloticky účinných substituovaných 1,3,4-oxadiazolů prováděný na KOBCH FaF UK. Porovnání antimykobakteriálních aktivit připravených 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů s předlohovými 5-alkyl/aryl-2-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazoly by mělo přispět k poznání role síry ve spojovacím řetězci mezi 1,3,4-oxadiazolem a 3,5-dinitrobenzylovým fragmentem. Bylo úspěšně připraveno 5 finálních 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů, jejich MIC byla stanovena a porovnána s předlohovými látkami.

V rámci práce byly provedeny pokusy o optimalizaci přípravy těchto látek. Bylo vyzkoušeno několik různých cest vedoucí k (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu, klíčové výchozí látky. Byl připraven 3,5-dinitrobenzylamin pomocí reakce 3,5-dinitrobenzylchloridu s azidem sodným a následnou redukcí 3,5-dinitrobenzylazidu nebo reakcí 3,5-dinitrobenzylchloridu s urotropinem s následující hydrolyzou meziprojektu. Přestože se podařilo připravit 3,5-dinitrobenzylamin a převést ho na (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanát, výtěžnost reakce byla velmi nízká. Jako optimální se jeví reakce thiokyanatanu draselného s 3,5-dinitrobenzylchloridem. U této reakce byly vyzkoušeny různé organická rozpouštědla a poměr reaktantů, ale maximální výtěžek (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu byl dosažen při použití DMF a zahřívání reakční směsi na 130 °C. Důležitým faktorem se také ukázalo být to, že thiokyanatan draselný byl přidán do předem vyhřátého roztoku 3,5-dinitrobenzyl chloridu v DMF. Postupné zahřívání reakční směsi vedlo ke zvýšení podílu 3,5-dinitrobenzylthiokyanátu.

Pro cyklizaci 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů na 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy byly vyzkoušeny dvě metody. První metoda (metoda A) spočívala v cyklizaci thiosemikarbazidu pomocí reakce s tosylchloridem v přítomnosti triethylaminu v THF. Reakční směsi se zahřívaly 25-50 hodin, ale i přesto nedocházelo k úplné konverzi výchozích látek. Výtěžnost této metody byla 30-60 %. Druhá metoda – metoda B, reakce thiosemikarbazidu s EDC·HCl v DMSO poskytovala vyšší výtěžky: 50-85 %. Výhodou této metody bylo i zkrácení reakčního času na 5-30 hodin. Zároveň se touto metodou podařilo

získat 5-cyklohexyl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-amin (**15**), který byl za podmínek metody A izolován jako směs s výchozí látkou.

U finálních látek byla stanovena jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivita. Účinnost na *M. tuberculosis* připravených 5-alkyl/aryl-*N*-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů byla porovnatelná s předlohovými strukturami. Nicméně finální látky byly výrazně méně aktivní vůči *M. avium* a *M. kansasii*. I přesto jsou připravené látky zajímavým předmětem dalšího výzkumu, kvůli možnosti alkylovat dusík ve spojovacím řetězci a připravit tak látky se zlepšenou rozpustností v organických rozpouštědlech a ve vodě.

9. SEZNAMY OBRÁZKŮ, SCHÉMAT A TABULEK

9.1. Seznam obrázků

Obrázek 1: Mykobakteriální buněčná stěna 1. glykolové lipidy 2. mykolové kyseliny 3. arabinogalaktan 4. peptidoglykan 5. cytoplazmatická membrána (převzato a upraveno: Harris, N.C., 2019) ¹⁴	17
Obrázek 2: Isoniazid	18
Obrázek 3: Rifampicin	19
Obrázek 4: Ethambutol	20
Obrázek 5: Pyrazinamid.....	20
Obrázek 6: Ofloxacin (vlevo) a moxifloxacin (vpravo)	21
Obrázek 7: Bedachilin.....	22
Obrázek 8: Linezolid.....	22
Obrázek 9: Clofazimin.....	23
Obrázek 10: Delamanid	23
Obrázek 11: Amikacin (vlevo) a streptomycin (vpravo)	24
Obrázek 12: Pretomanid	25
Obrázek 13: BTZ043 (vlevo) a PBTZ-169 (vpravo)	25
Obrázek 14: DNB1 (vlevo), MTX (vpravo), CT319 (dole).....	26
Obrázek 15: Substituovaný 2-benzylsulfanylbenzimidazol, -benzoxazol a -benzthiazol	27
Obrázek 16: Substituovaný tetrazol (R=alkyl, aryl) a 5-substituovaný 2-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazol, 1,3,4-thiadiazol (R=alkyl, aryl, X=O,S) a 3,4-di(alkyl/aryl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-4 <i>H</i> -1,2,4-triazol.	28
Obrázek 17: Tetrazoly s modifikovaným spojovacím řetězcem X=-O-, -S-, -Se-, -SO-, -SO ₂ -	29
Obrázek 18: 1-Alkyl/aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1 <i>H</i> -tetrazol (vlevo, předlohová látka), 1-alkyl/aryl-5-(3,5-dinitrofenyl)sulfanyl-1 <i>H</i> -tetrazol (uprostřed) a 1-alkyl/aryl-3,5-dinitrofenyl-1 <i>H</i> -tetrazol (vpravo)	29

Obrázek 19: Obecná struktura připravovaných 1,3,4-oxadiazolů v porovnání s původními 1,3,4-oxadiazoly.....	30
Obrázek 20: Přehled finálních látek.....	54
Obrázek 21: Struktura předlohových látek	55

9.2. Seznam schémat

Schéma 1: Příprava 3,5-dinitrobenzamidů.....	31
Schéma 2: Příprava 3,5-dinitrobenzylaminu.....	32
Schéma 3: Příprava 3,5-dinitrobenzylazidu	33
Schéma 4: Příprava 3,5-dinitrobenzylaminu pomocí trifenylfosfinu	34
Schéma 5: Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu z 3,5-dinitrobenzylaminu.....	35
Schéma 6: Příprava a následná hydrolýza 1-(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,5,7-tetraazaadamantan-1-ium chloridu	36
Schéma 7: Příprava 3,5-dinitrobenzylisothiokyanátu z hydrochloridu 3,5 dinitrobenzylaminu	37
Schéma 8: Příprava (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu	38
Schéma 9: Příprava 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidu.....	41
Schéma 10: Cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů na 5-aryl- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy pomocí pyridinu, TsCl v THF	45
Schéma 11: Cyklizace 1-acyl-4-(3,5-dinitrobenzyl)thiosemikarbazidů na 5-alkyl/aryl- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy pomocí EDC·HCl v DMSO	46
Schéma 12: Alkylace <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzyl)-5-(4-methylfenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminu	50

9.3. Seznam tabulek

Tabulka 1: Léčiva 2. linie dle WHO ¹⁰	16
Tabulka 2: Antimykobakteriální aktivita 2-benzylsulfanylbenzazolů (uvedeny hodnoty MIC v μM)	27
Tabulka 3: Provedené pokusy o optimalizaci syntézy (3,5-dinitrobenzyl)isothiokyanátu	40
Tabulka 4: Antimykobakteriální aktivita finálních látek (uvedeny hodnoty MIC v μmol.l ⁻¹)	54

Tabulka 5: Antimykobakteriální aktivita předlohových látek (uvedeny hodnoty MIC v $\mu\text{mol.l}^{-1}$)⁵⁵ 55

10. ZDROJE

- 1 BAYRAKTAR, Banu, Emin BULUT, Ayşe Bayrı BARIŞ, Buket TOKSOY, Nazan DALGIC, Cigdem CELIKKAN a Dilek SEVGI. Species Distribution of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Clinical Isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a Prospective Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49(11), 3837-3841. ISSN 0095-1137. DOI:10.1128/JCM.01172-11
- 2 Tuberculosis (TB). Center for Disease Control and Prevention [online]. 2016 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>
- 3 Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management [online]. In: Geneva: World Health Organization, 2018 [cit. 2022-07-19]. ISBN 978-92-4-155023-9. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260233>
- 4 SUÁREZ, Isabelle, Sarah Maria FÜNGER, Stefan KRÖGER, Jessica RADEMACHER, Gerd FÄTKENHEUER a Jan RYBNIKER. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2019. ISSN 1866-0452. DOI:10.3238/arztebl.2019.0729
- 5 Tuberculosis. World Health Organization [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1
- 6 Tuberculosis. World Health Organization [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
- 7 EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. a EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY. European Union standards for tuberculosis care: 2017 update.. LU: Publications Office, 2018. DOI: 10.2900/308103. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/tuberculosis/prevention-and-control/european-union-standards-tuberculosis-care>
- 8 SEUNG, Kwonjune J., Salmaan KESHAVJEE a Michael L. RICH. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015, 5(9). ISSN 2157-1422. DOI: 10.1101/cshperspect.a017863

- 9 WALLENFELS, Jiří, Martina VAŠÁKOVÁ a Ivan SOLOVIČ. Current pharmacotherapy of tuberculosis. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2019, 32(4), 10-14. ISSN 12127973. DOI: 10.36290/far.2018.032
- 10 WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment [online]. In: . Geneva: World Health Organization, 2020 [cit. 2022-07-19]. ISBN 978-92-4-000704-8. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240007048>
- 11 GHAZAEI, Ciamak. Mycobacterium tuberculosis and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. *Journal of Research in Medical Sciences*. 2018, 23(1). ISSN 1735-1995. Dostupné z: doi:10.4103/jrms.JRMS_904_17
- 12 CHIKHALE, Rupesh V., Mahesh A. BARMADÉ, Prashant R. MURUMKAR a Mange Ram YADAV. Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, 61(19), 8563-8593. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00281
- 13 CHIARADIA, Laura, Cyril LEFEBVRE, Julien PARRA, Julien MARCOUX, Odile BURLET-SCHILTZ, Gilles ETIENNE, Maryelle TROPIS a Mamadou DAFFÉ. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Scientific Reports*. 2017, 7(1). ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/s41598-017-12718-4
- 14 HARRIS, Nicholas Charles. Biosynthesis of isonitrile lipopeptides by conserved nonribosomal peptide synthetase gene clusters in Actinobacteria. Berkeley, Kalifornie, Spojené státy americké, 2019. Dostupné také z: <https://escholarship.org/uc/item/38g6g6f0>. Disertační práce. UC Berkeley. Vedoucí práce Zhang, Wenjun.
- 15 Isoniazid. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00951>
- 16 Delamanid. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11637>
- 17 *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 5. 2014. ISSN 0976-500X. DOI: 10.4103/0976-500X.136121

- 18 VERGNE, Isabelle, Jennifer CHUA a Vojo DERETIC. Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel Ca²⁺ /Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade. *Journal of Experimental Medicine*. 2003, 198(4), 653-659. ISSN 1540-9538. DOI:10.1084/jem.20030527
- 19 Rifampicin. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01045>
- 20 Ethambutol. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00330>
- 21 Pyrazinamide. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00339>
- 22 PRANGER, A. D., T. S. VAN DER WERF, J. G. W. KOSTERINK a J. W. C. ALFFENAAR. The Role of Fluoroquinolones in the Treatment of Tuberculosis in 2019. *Drugs*. 2019, 79(2), 161-171. ISSN 0012-6667. DOI: 10.1007/s40265-018-1043-y
- 23 PITMAN, HOANG, WI, ALSHEIKH, HINER a PERCIVAL. Revisiting Oral Fluoroquinolone and Multivalent Cation Drug-Drug Interactions: Are They Still Relevant?. *Antibiotics*. 2019, 8(3). ISSN 2079-6382. DOI:10.3390/antibiotics8030108
- 24 BERNING, Shaun E. The Role of Fluoroquinolones in Tuberculosis Today. *Drugs*. 2001, 61(1), 9-18. ISSN 0012-6667. DOI:10.2165/00003495-200161010-00002
- 25 Levofloxacin. *Tuberculosis*. 2008, 88(2), 119-121. ISSN 14729792. DOI: 10.1016/S1472-9792(08)70013-1
- 26 Moxifloxacin. *Tuberculosis*. 2008, 88(2), 127-131. ISSN 14729792. DOI: 10.1016/S1472-9792(08)70016-7
- 27 Levofloxacin. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01137>
- 28 Moxifloxacin. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00218>

- 29 LAKSHMANAN, Mageshwaran a Alphienes Stanley XAVIER. Bedaquiline – The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis. *Journal of Young Pharmacists*. 2013, 5(4), 112-115. ISSN 09751483. DOI: 10.1016/j.jyp.2013.12.002
- 30 Bedaquiline. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08903>
- 31 Linezolid. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00601>
- 32 SCHECTER, G. F., C. SCOTT, L. TRUE, A. RAFTERY, J. FLOOD a S. MASE. Linezolid in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2010, 50(1), 49-55. ISSN 1058-4838. DOI: 10.1086/648675
- 33 Clofazimine. DrugBank Online [online]. c2022[cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00845>
- 34 GOPAL, M., N. PADAYATCHI, J. Z. METCALFE a M. R. O'DONNELL. Systematic review of clofazimine for the treatment of drug-resistant tuberculosis [Review article]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2013, 17(8), 1001-1007. ISSN 10273719. DOI: 10.5588/ijtld.12.0144
- 35 LAKSHMANAN, Mageshwaran a Alphienes Stanley XAVIER. Bedaquiline – The first ATP synthase inhibitor against multi drug resistant tuberculosis. *Journal of Young Pharmacists*. 2013, 5(4), 112-115. ISSN 09751483. DOI:10.1016/j.jyp.2013.12.002
- 36 Bedaquiline. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08903>
- 37 Amikacin. *Tuberculosis*. 2008, 88(2), 87-88. ISSN 14729792. DOI: 10.1016/S1472-9792(08)70003-9
- 38 Amikacin. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00479>
- 39 Waters M, Tadi P. Streptomycin. 2022 May 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32310346.

- 40 Streptomycin. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01082>
- 41 Tuberculosis. 88. 2008. ISSN 14729792. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472979208700271>
- 42 Summary of product characteristics: Dovprela. European Medicines Agency [online]. [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/dovprela-previously-pretomanid-fgk>
- 43 Pretomanid. DrugBank Online [online]. c2022 [cit. 2022-07-20]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB05154>
- 44 LECHARTIER, Benoit, Ruben C. HARTKOORN a Stewart T. COLE. In Vitro Combination Studies of Benzothiazinone Lead Compound BTZ043 against Mycobacterium tuberculosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012, 56(11), 5790-5793. ISSN 0066-4804. DOI:10.1128/AAC.01476-12
- 45 MAKAROV, Vadim, Benoit LECHARTIER, Ming ZHANG, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. EMBO Molecular Medicine. 2014, 6(3), 372-383. ISSN 1757-4676. DOI:10.1002/emmm.201303575
- 46 MAKAROV, Vadim, Giulia MANINA, Katarina MIKUSOVA, et al. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. Science. 2009, 324(5928), 801-804. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1171583
- 47 MAKAROV, Vadim, Benoit LECHARTIER, Ming ZHANG, et al. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. EMBO Molecular Medicine. 2014, 6(3), 372-383. ISSN 1757-4676. DOI: 10.1002/emmm.201303575
- 48 TREFZER, Claudia, Monica RENGIFO-GONZALEZ, Marlon J. HINNER, Patricia SCHNEIDER, Vadim MAKAROV, Stewart T. COLE a Kai JOHNSON. Benzothiazinones: Prodrugs That Covalently Modify the Decaprenylphosphoryl- β -D-ribose 2'-epimerase DprE1 of Mycobacterium tuberculosis. Journal of the American Chemical Society. 2010, 132(39), 13663-13665. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja106357w

49 KOČÍ, Jan, Věra KLIMEŠOVÁ, Karel WAISSER, Jarmila KAUSTOVÁ, Hans-Martin DAHSE a Ute MÖLLMANN. Heterocyclic benzazole derivatives with antimycobacterial In vitro activity. 2002, 12(22), 3275-3278. ISSN 0960894X. DOI: 10.1016/S0960-894X(02)00697-2

50 KLIMEŠOVÁ, Věra, Jan KOČÍ, Milan POUR, Jiří STACHEL, Karel WAISSER a Jarmila KAUSTOVÁ. Synthesis and preliminary evaluation of benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 2002, 37(5), 409-418. ISSN 02235234. DOI: 10.1016/S0223-5234(02)01342-9

51 KLIMEŠOVÁ, Věra, Jan KOČÍ, Karel WAISSER, Jarmila KAUSTOVÁ a Ute MÖLLMANN. Preparation and in vitro evaluation of benzylsulfanyl benzoxazole derivatives as potential antituberculosis agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 2009, 44(5), 2286-2293. ISSN 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.06.027

52 KARABANOVICH, Galina, Jaroslav ROH, Tomáš SMUTNÝ, 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. ISSN 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.069

53 NĚMEČEK, Jan, Pavel SYCHRA, Miloslav MACHÁČEK, et al. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017, 130, 419-432. ISSN 02235234. DOI:10.1016/j.ejmech.2017.02.058

54 KARABANOVICH, Galina, Jan DUŠEK, Karin SAVKOVÁ, et al. Development of 3,5-Dinitrophenyl-Containing 1,2,4-Triazoles and Their Trifluoromethyl Analogues as Highly Efficient Antitubercular Agents Inhibiting Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-Oxidase. Journal of Medicinal Chemistry. 2019, 62(17), 8115-8139. ISSN 0022-2623. DOI:10.1021/acs.jmedchem.9b00912

55 KARABANOVICH, Galina, Júlia ZEMANOVÁ, Tomáš SMUTNÝ, et al. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. Journal

of Medicinal Chemistry. 2016, 59(6), 2362-2380. ISSN 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00608

56 KARABANOVICH, Galina, Jaroslav ROH, Tomáš SMUTNÝ, 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. ISSN 02235234. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.069

57 DOLMAN, Sarah J., Francis GOSSELIN, Paul D. O'SHEA a Ian W. DAVIES. Superior Reactivity of Thiosemicarbazides in the Synthesis of 2-Amino-1,3,4-oxadiazoles. The Journal of Organic Chemistry. 2006, 71(25), 9548-9551. ISSN 0022-3263. DOI: 10.1021/jo0618730

58 YANG, Seung-Ju, Seok-Hyeong LEE, Hyun-Jung KWAK a Young-Dae GONG. Regioselective Synthesis of 2-Amino-Substituted 1,3,4-Oxadiazole and 1,3,4-Thiadiazole Derivatives via Reagent-Based Cyclization of Thiosemicarbazide Intermediate. The Journal of Organic Chemistry. 2013, 78(2), 438-444. ISSN 0022-3263. DOI: 10.1021/jo302324r

59 HASEGAWA, Masatoshi, Ryoko TOKUNAGA, Kana HASHIMOTO a Junichi ISHII. Crosslinkable polyimides obtained from a reactive diamine and the effect of crosslinking on the thermal properties. Reactive and Functional Polymers. 2019, 139, 181-188. ISSN 13815148. DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2019.04.005

60 SAJIKI, Hironao, Yoshiaki KITAMURA, Kazumi TANIGUCHI, Tomohiro MAEGAWA, Yasunari MONGUCHI a Yukio KITADE. Copper/HP20: Novel and Polymer-Supported Copper Catalyst for Huisgen Cycloaddition. HETEROCYCLES. 2009, 77(1). ISSN 0385-5414. DOI:10.3987/COM-08-S(F)56

61 JOCE, Catherine, Rebecca WHITE, Peter G. STOCKLEY, Stuart WARRINER, W. Bruce TURNBULL a Adam NELSON. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel bivalent S-adenosylmethionine analogues. 2012, 22(1), 278-284. ISSN 0960894X. DOI:10.1016/j.bmcl.2011.11.017

62 KARABANOVICH, Galina, Jan DUŠEK, Karin SAVKOVÁ, et al. Development of 3,5-Dinitrophenyl-Containing 1,2,4-Triazoles and Their Trifluoromethyl Analogues as Highly

Efficient Antitubercular Agents Inhibiting Decaprenylphosphoryl- β -D-ribofuranose 2'-Oxidase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2019, 62(17), 8115-8139. ISSN 0022-2623. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00912