

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



Syntéza agonistů myšního CAR receptoru

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marcel Špulák Ph.D.

Hradec Králové, 2022

Ing. Michala Jirsová

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli PharmDr. Marcelovi Špulákovi, Ph.D. za odborné vedení a Mgr. Michalovi Kadaníkovi za trpělivost, cenné informace, a ochotu s čímkoliv pomoci. Dále můj dík patří doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Janě Maříkové za měření NMR spekter, PharmDr. Zbyňkovi Brůžovi, Ph.D. za příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině za podporu při studiu.

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

V Hradci Králové dne 15. 5. 2022

Ing. Michala Jirsová

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Ing. Michala Jirsová

Školitel: PharmDr. Marcel Špulák Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza agonistů myšního CAR receptoru

Tato práce je zaměřena na syntézu potenciálních agonistů myšního CAR receptoru. Jedná se o strukturní obměny předlohy molekuly TCPOBOP, kdy byl jeden ze dvou pyridinových cyklů ze struktury vynechán a fenylový fragment byl substituován elektron donorovými i akceptorovými funkčními skupinami. Syntézy byly uskutečněny na základě nukleofilní aromatické substituce vycházející z 2,3,5-trichlorpyridinu a příslušně obměněného fenolu. Byla připravena série dvaceti derivátů pyridinu, u nichž byl stanoven jejich potenciální agonismus/antagonismus vůči myšímu CAR receptoru. Pět z testovaných látek vykazovalo slabý aktivační účinek, ovšem u dalších tří látek byla pozorována potenciální inhibiční aktivita. Tyto připravené sloučeniny byly rovněž testovány pro ověření jejich potenciální toxicity na HepG2 buněčné linii, bakteriích, mykobakteriích a fungálních kmenech. Aktivita byla pozorována pouze u jednoho mykobakteriálního kmenu, jednalo se o *Mycobacterium kansasii*.

Klíčová slova: CAR receptor, pyridin, fenol, nukleofilní aromatická substituce

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Ing. Michala Jirsová

Supervisor: PharmDr. Marcel Špulák Ph.D.

Title of thesis: Synthesis of mouse CAR receptor analogs

This diploma thesis is focused on the synthesis of potential mouse CAR receptor agonists. Prepared compounds resulted from the structural changes of the template molecule TCPOBOP, when one of the two pyridine rings was removed from the structure and the phenyl moiety was substituted by both electron donor and acceptor functional groups. The syntheses were carried out on the basis of nucleophilic aromatic substitution starting from 2,3,5-trichloropyridine and appropriately substituted phenol. A series of twenty derivatives were prepared and their potential agonism/antagonism against the mouse CAR receptor was determined. Five of the tested substances showed a weak activation effect, furthermore, potential inhibitory activity was observed for the other three substances. These prepared compounds were tested on the HepG2 cell line, and their possible effect on selected bacteria, mycobacteria and fungal strains was also investigated to verify potential toxicity. Activity was observed in only one mycobacterial strain, *Mycobacterium kansasii*.

Keywords: CAR receptor, pyridine, phenol, nucleophilic aromatic substitution

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	1
2.	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Konstitutivní androstanový receptor (CAR).....	2
2.1.1	Struktura CAR receptoru .....	4
2.1.2	Aktivace CAR receptoru .....	5
2.1.3	Ligandy CAR receptoru.....	7
2.1.4	Funkce CAR receptoru .....	11
2.1.4.1	Detoxikační mechanismy CAR .....	11
2.1.4.2	CAR jako senzor glukózy a lipidů.....	12
2.1.4.3	CAR jako regulátor steroidních a štítných hormonů .....	14
2.1.4.4	CAR jako regulátor metabolismu bilirubinu a žlučových kyselin. ....	15
2.1.4.5	CAR a jeho funkce v mozku.....	16
2.1.4.6	Vliv CAR na zánětlivou střevní reakci .....	17
2.1.4.7	CAR a hepatokarcinogeneze.....	18
2.2	Nukleofilní aromatická substituce .....	18
2.2.1	Šestičlenný heterocyklus pyridinu.....	20
2.2.1.1	Reaktivita pyridinu .....	21
2.2.1.2	Regioselektivita pyridinu.....	22
2.2.1.3	Nukleofilní substituce 2,3,5-trichlorpyridinu .....	24
3.	CÍL PRÁCE.....	26
4.	VÝSLEDKY S KOMENTÁŘI .....	29
4.1	Deriváty 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituované v poloze 4' .....	29
4.2	Deriváty 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituované v poloze 3' .....	30
4.3	Příprava 2-[(3-bromnaftalen-2-yl)]-3,5-dichlorpyridinu .....	31
4.4	Příprava 3,5-dichlor-2-(pyridin-4-yloxy)pyridinu .....	31
4.5	Příprava 3,5-dichlor-2-(pyridin-2-yloxy)pyridinu .....	32
4.6	Příprava 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinolinu .....	32
4.7	Pokusy o přípravu 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]pyrimidinu.....	33
4.8	Pokusy o přípravu 4-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinazolinu.....	34
4.9	Biologické hodnocení .....	35
4.9.1	Testování aktivace CAR receptoru.....	35
4.9.2	Stanovení bakteriální toxicity .....	37
4.9.3	Stanovení antimykotické aktivity .....	39
4.9.4	Stanovení mykobakteriální toxicity.....	41
5.	ZÁVĚR.....	42
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
6.1	Obecné postupy použité při separaci a charakterizaci látek .....	43
6.2	Obecné metody použité při biologickém hodnocení .....	45
6.2.1	Metoda Luciferase Reporter Assay .....	45
6.2.2	Mikrodiluční bujónový test .....	45

6.3	Syntéza a charakterizace látek .....	48
6.3.1	Provedení syntéz 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinů.....	48
6.3.2	Syntéza 2-(3-bromnaftalen-2-yloxy)-3,5-dichlorpyridinu.....	57
6.3.3	Syntézy 3,5-dichlorpyridinů s heteroaromátem v poloze 2 .....	58
7.	LITERATURA .....	61
8.	PŘÍLOHOVÁ ČÁST.....	65
8.1	Seznam použitých zkratek .....	65
8.2	Seznam schémat.....	65
8.3	Seznam obrázků.....	69
8.4	Seznam tabulek .....	70

# 1. ÚVOD

Konstitutivní androstanový receptor (CAR) je členem superrodiny nukleárních receptorů, který je především exprimován v játrech a tenkém střevě.<sup>1</sup> Ačkoliv jsou přesné funkce CAR receptoru stálým předmětem výzkumu, lze jej považovat za klíčový xenosenzor, podílející se na regulaci nejen xenobiotického, ale i endobiotického metabolismu, a to především díky vlivu na expresi enzymů metabolismu I. a II. fáze a také některých z transportérů. V průběhu zkoumání však bylo zjištěno, že také disponuje významným pleiotropním účinkem nejen na fyziologické, ale i patologické procesy v organismu.<sup>2</sup> Jeho aktivací je možná detoxikace a exkrece endogenních metabolitů, jako jsou žlučové kyseliny a bilirubin. Je schopen zásadně ovlivnit metabolismus lipidů a glukózy, ale také pohlavních a thyroïdních hormonů.<sup>3</sup> Nejnovější studie poukazují na jeho možnost podílet se na komunikaci mezi jednotlivými buňkami, regulaci buněčného cyklu a karcinogenezi.<sup>4</sup>

Díky těmto zásadním vlivům je v současné době intenzivně zkoumán jeho terapeutický potenciál, ovšem doposud známé ligandy myšního či lidského CAR receptoru jsou buď nepřímé nebo velmi málo selektivní, a proto je snaha najít nové ligandy, které by umožnily detailnější porozumění funkcí tohoto receptoru.<sup>5</sup>

Prostřednictvím nukleofilní aromatické substituce bylo v této práci připraveno celkem dvacet látek, a to reakcí 2,3,5-trichlorpyridinu s komerčně dostupnými fenoly, za účelem vývoje potenciálně více selektivních a přímých agonistů myšního, případně lidského CAR receptoru.

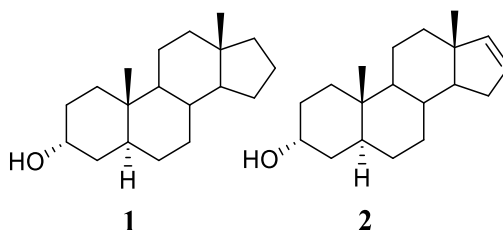


## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Konstitutivní androstanový receptor (CAR)

CAR receptor je členem nejen superrodiny nukleárních receptorů, ale také spadá hlouběji do podrodiny 1, skupiny I a třídy 3. U lidí je kódován genem NR1I3.<sup>3</sup> Poprvé byl popsán v roce 1994, kdy byla izolována jeho lidská cDNA<sup>4</sup> a dříve byl označován jako MB67. Myší receptor byl izolován a popsán až o několik let později v roce 1997.<sup>5</sup> Zkratka CAR původně vycházející z „*constitutive activator of retinoic response*“ byla dříve přisuzována jeho schopnosti vytvářet heterodimer s pregnanovým X receptorem (PXR).<sup>4-5</sup> Takto vzniklý heterodimerní komplex umožňuje bezprostředně cílit na responzivní elementy retinové kyseliny (RAREs) v promotorových oblastech genů. CAR a PXR tak regulují geny s důležitými metabolickými funkcemi.<sup>6</sup> Rozsah CAR aktivity je však v porovnání s PXR výrazně nižší.<sup>5</sup>

Později bylo zjištěno, že dva metabolity testosteronu (**Obrázek 1**) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (androstanol) **1** a 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol (androstenol) **2** se vyznačují schopností potlačit konstitutivní aktivitu CAR *in vitro*. Jedná se tak o endogenní ligandy působící jako inverzní agonisté.<sup>7-8</sup>



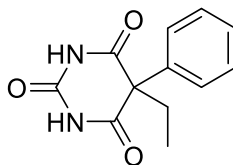
**Obrázek 1.** Inverzní agonisté CAR receptoru androstanol **1** a androstenol **2**.<sup>7</sup>

V rámci rodiny nukleárních receptorů CAR vyniká svou unikátní schopností být konstitutivně aktivní i v nepřítomnosti přímo se vázajících ligandů. Současně si však zachovává jistou možnost být aktivován a případně inhibován přímými i nepřímými chemickými modulátory různých struktur,<sup>6</sup> proto je dnes tento receptor nazýván jako „konstitutivní androstanový receptor“.<sup>4</sup> Z toho plyne, že CAR receptor může být aktivován dvojím způsobem, a to buď přímou aktivací prostřednictvím ligandu, nebo nepřímým aktivačním mechanismem.<sup>3</sup>

Někdy se lze také setkat u CAR receptoru s označením sirotčí „*orphan*“ receptor, a to z toho důvodu, že jejich přirozený selektivní fyziologický ligand není zcela znám, i přestože jsou známé endogenní i exogenní sloučeniny aktivující tento receptor. Jelikož jsou pro tyto receptory popsány funkční ligandy, může být dále konkrétněji řazen mezi „*adopted orphan*“ receptor. Tento pojem je využíván v případech, že endogenní ligand byl objeven až po nalezení receptoru. Vzhledem k tomu, že endogenní ligand je již znám, ale jeho fyziologická funkce není zcela jasně objasněna, lze se také setkat s označením receptoru „*mystery orphan*“<sup>4</sup>

Zájem o CAR receptor byl v počátcích jeho objevu velmi nízký, avšak v posledních letech značně vzrostl.<sup>5</sup> Vzhledem k tomu, že přesná role CAR receptoru není ještě zcela prozkoumána, především z nedostatku přímých a selektivních ligandů, je velká snaha o komplexní porozumění jeho významu.<sup>5</sup>

První studie prostřednictvím fenobarbitalu **3** (**Obrázek 2**) a podobně působících induktorů přineslo řadu významných poznání ohledně jeho fyziologických funkcí. Bylo prokázáno, že aktivací CAR receptoru fenobarbitalem vede k indukci genů kódujících CYP2B podrodiny cytochromu P450. Tím byla odhalena jeho potenciální role v detoxikačních a exkrečních mechanismech xenobiotik, proto je také často označován jako „*xenosenzor*“.<sup>7</sup>



**3**

**Obrázek 2.** Fenobarbital jako aktivátor CAR.<sup>4</sup>

Vzhledem k tomu, že CAR poskytuje unikátní integrovaný systém skrze signalizační dráhy vlivem přímé modulace exprese genu a také vzájemnou interakcí s dalšími nukleárními receptory, je proto zřejmě schopen řídit i metabolismus endogenně produkovaných látek.<sup>5</sup> Dosavadní studie poukazují především na ovlivnění metabolismu lipidů, glukózy, bilirubinu, žlučových kyselin, thyroïdních a pohlavních hormonů.<sup>3</sup>

### 2.1.1 Struktura CAR receptoru

Struktury nukleárních receptorů jsou si vzájemně velmi blízké a jejich molekuly tak nesou charakteristické uspořádání. Běžné nukleární receptory se obvykle skládají z pěti proteinových domén, přičemž pro CAR jsou typické čtyři majoritní úseky, jako je ligand-vázající doména, DNA-vázající doména a dvě transkripční domény AF-1 a AF-2 (**Obrázek 3**).<sup>8</sup> Tento nepatrný rozdíl by mohl vysvětlovat některé jedinečné vlastnosti CAR receptoru, případně i jeho konstitutivní aktivitu.<sup>9</sup> CAR receptory se od běžných nukleárních receptorů také výrazně odlišují flexibilnější a větší hydrofilní kapsou, takzvanou ligand-vázající doménou na C-konci, nazývanou LBD.<sup>10</sup> Na základě uspořádaných aminokyselinových skupin v nich dochází k nekovalentním interakcím ligandů, například hormonů, žlučových kyselin, lipidů a různých xenobiotik.<sup>11</sup> Díky tomu tyto receptory nesou nižší substrátovou specifitu, a tím umožňují vazbu široké škále sloučenin lišící se svou strukturou.<sup>12</sup> V této části jsou také přítomny signální proteinové regiony, např. NLS (*nuclear localisation signal*) či NES1 a NES2 (*nuclear export signal*). Signální proteiny zajišťují pohyb mezi jádrem. Samotnou lokalizaci receptoru v buňce umožňuje sekvence XRS (*xenobiotic responsive sequence*), nacházející se taktéž na C-konci receptoru.<sup>4</sup>

Druhou významnou částí receptoru je takzvaná DNA-vázající doména na N-konci, označována jako DBD. Jedná se o nejvíce konzervativní úsek obsahující jedinečné struktury, které dokážou rozpoznat a vázat se na specifické promotorové oblasti v cílových genech. Umožňují tak vazbu receptoru na specifickou regulační sekvenci DNA na promotoru genu, nazývanou responzivní element (RE). Je to oblast, která konkrétně určuje geny, u kterých prostřednictvím jaderného receptoru dochází k indukci transkripce.<sup>4, 12</sup>

Na N-konci se také nachází AF-1 doména, která je na ligandu nezávislá a zodpovídá za jistou aktivitu receptoru na konkrétní tkáni. C-konec receptoru disponuje AF-2 doménou, která je na ligandu závislá.<sup>13</sup> Díky této doméně dochází po navázání ligandu ke konformačním změnám receptoru. Mezi LBD a DBD je lokalizován takzvaný „*Hinge region*“ umožňující mezi oběma konci rotaci, díky čemuž může dojít k interakci dimerů s asymetrickou sekvencí DNA.<sup>8</sup>



**Obrázek 3.** *Struktura CAR receptoru.*<sup>14</sup>

CAR váže DNA v podobě heterodimerního komplexu s retinoidním X receptorem (RXR), přičemž interaguje primárně s RXR alfa izoformou. Interakce s gama nebo beta izoformou RXR není dosud známá.<sup>6</sup>

### 2.1.2 Aktivace CAR receptoru

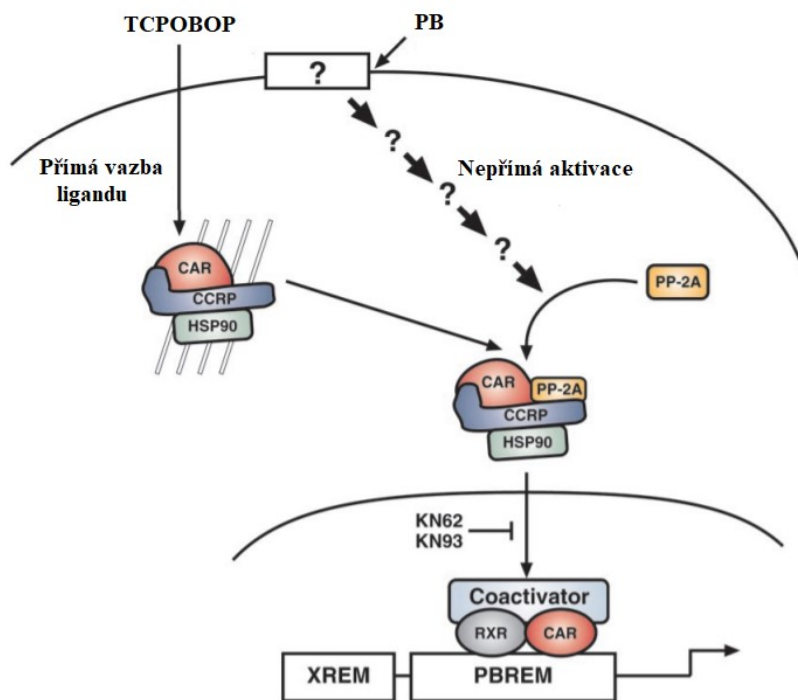
CAR receptor je z velké části exprimován v tkáních, ve kterých dochází ke vstupu a metabolismu xenobiotik, a to především v detoxikačních orgánech, jako jsou játra, ledviny a tenké střevo. V cytosolu těchto tkání se nachází v přirozeném stavu fosforylovaný a tvoří multiproteinový komplex s proteinem tepelného šoku 90 (HSP90), cytoplazmatickým retenčním proteinem (CCRP) a také s membránovou proteinovou podjednotkou (PPP1R16A). Dané proteiny udržují CAR v cytosolu v neaktivní podobě.<sup>3-4</sup> Tím, že se nachází v cytoplazmě přirozeně a není stejně jako ostatní jaderné receptory lokalizován přímo v jádře, je zabráněno chronické aktivaci CAR cílových genů a je tak umožněna adekvátní regulace jeho aktivity.<sup>15</sup>

Jako takzvaný sirotčí receptor může být aktivován širokým spektrem xenobiotických látek často již v mikromolárních koncentracích. Do aktivní podoby může být převeden dvěma předpokládanými způsoby, a to buď přímou vazbou ligandu nebo na ligandu nezávislým (nepřímým) mechanismem. Z toho může být patrné, že aktivace CAR je vícestupňový proces a většina identifikovaných aktivátorů se nemusí přímo vázat na receptor.<sup>4</sup>

Oba mechanismy vedou k uvolnění CAR z multiproteinového komplexu s následnou defosforylací a translokací do jádra přes jadernou membránu, kde posléze vytváří heterodimer s retinoidním X receptorem. Jedná se o velice komplexní děj v buněčném jádře, na kterém se účastní celá řada přítomných koaktivátorů, které se váží přímo na heterodimer CAR/RXR (**Obrázek 4**).<sup>16</sup>

**Přímá aktivace** spočívá v navázání ligandu LBD, takzvaného agonisty. Po jeho navázání k makromolekulárnímu komplexu dochází k defosforylaci proteinovou fosfatázou PP-2A a následně je umožněna translokace CAR do jádra. Na počátku zkoumání byl identifikován již zmíněný androstanol a androstenol jako inverzní agonisté CAR. Mechanismus působení těchto inverzních agonistů spočívá v převedení CAR z konstituční na bazální aktivitu, a to narušením můstku, který blokuje šroubovici H12 v její aktivní konformaci. To následně podporuje uvolňování koaktivátoru z LBD bez interference dimerizace CAR/RXR nebo vazby DNA.<sup>14</sup>

**Nepřímá aktivace** je charakteristickým rysem CAR, ta jej odlišuje od klasických jaderných receptorů. Tento mechanismus zahrnuje ne příliš prostudovanou kaskádu, při které dochází k aktivaci CAR receptoru umístěného v cytoplasmě, který podstupuje bez vazby ligandu defosforylaci fosfatázou 2A (PP-2A). Tím je umožněna jeho translokace do jádra. Jaderná akumulace je tak nezávislá na ligandu a konstitutivní aktivitě. Translokace CAR do jádra je uskutečněna bez interakce LBD receptoru.<sup>14</sup> V samotném jádře je umožněna vazba CAR na responzivní sekvenci (CAR-RE) v promotorové oblasti cílových genů, čímž je aktivována RNA polymeráza a samotná transkripce může být zahájena.<sup>8, 11</sup>



**Obrázek 4.** Přímá a nepřímá cesta aktivace CAR receptoru.<sup>16</sup>

Po navázání ligandu TCPOBOP k makromolekulárnímu komplexu dochází k defosforylaci katalyzovanou proteinovou fosfatázou PP-2A, následně je možná translokace CAR do jádra, v tomto případě se jedná o přímou cestu aktivace. Naopak fenobarbital je nepřímým aktivátorem CAR a PP-2A aktivuje zatím neznámým způsobem. CAR je tak translokován do jádra na ligandu nezávislou cestou. Po vstupu do samotného jádra dochází k další aktivaci CAR prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodium dependentní kinázy, přičemž KN62 a KN93 jsou jejími inhibitory. Dochází k heterodimerizaci CAR/RXR $\alpha$ , k navázání koaktivátoru, a také je CAR-DBD vázán k phenobarbital-responsive enhancer modulu (PBREM), který se nachází v promotorech cílových genů.<sup>16</sup>

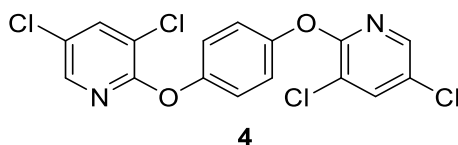
### 2.1.3 Ligandy CAR receptoru

Od samého počátku identifikace CAR se předpokládalo, že by mohl být konstitutivně aktivní i za nepřítomnosti jakéhokoli spouštěcího ligandu.<sup>17</sup> Dlouhou dobu se uvažovalo, že CAR nemá žádný přirozeně aktivační (endogenní) ligand, ovšem v průběhu let se ukázalo, že CAR může být regulován řadou endobiotik, včetně steroidů jako jsou již zmiňované androstany (androstanol a androstenol), ale také estrogeny či progesterony. Regulován může být i metabolity žlučových kyselin a cholesterolu. Navíc mnoho xenobiotik, jako jsou například klinická léčiva, ale také pesticidy či flovonoidy, mohou být taktéž modulátory CAR receptoru.<sup>6</sup> Nutné je ale podotknout, že afinita již známých endogenních ligandů k CAR receptoru je velmi nízká a doposud stále není identifikován endogenní ligand s vysokou afinitou k CAR receptoru. Z toho důvodu by měl být stále považován za takzvaný *orphan receptor*.<sup>5</sup>

Lidská a hlodavčí CAR sdílí několik společných charakteristik, jako je například jaderná translokace, nebo vazba na PBREM. Ovšem pozoruhodnou druhovou selektivitu vykazuje CAR ve vazbě ligandu a ve způsobu aktivace. Navíc bylo také identifikováno mnoho izoform lidské hCAR, kdy v některých případech jsou konstitutivně aktivní a jiné jsou striktně indukovatelné pouze ligandem.<sup>18</sup> Jelikož tyto izoformy u hlodavčí mCAR neexistují, data generovaná z modelů hlodavců nemusí přesně odrážet lidské funkce CAR.<sup>6</sup>

Studie odhalily jako prvního přímého agonistu TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridin-2-yloxy)]benzen) **4 (Obrázek 5)**, který v závislosti na dávce obnovuje aktivitu myšího CAR receptoru. Receptory mohou být také inhibovány

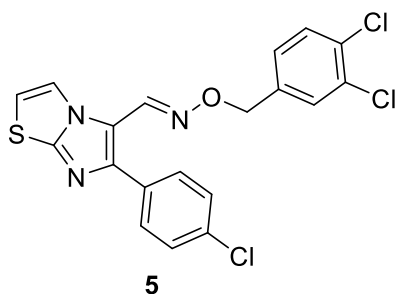
inverzními agonisty, jako je například androstanol, jehož farmakologické koncentrace potlačují pouze myší receptor, nikoli však lidský. Samotný TCPOBOP je taktéž schopen aktivovat pouze myší CAR receptor.<sup>5</sup>



**Obrázek 5.** TCPOBOP jako přímý agonista mCAR.<sup>15</sup>

První selektivní agonista lidského CAR lze považovat molekulu CITCO 6-(4-chlorfenyl)imidazo[2,1-*b*][1,3]thiazol-5-karbaldehyd-(3,4-dichlorbenzyl)-oxim **5** (Obrázek 6). Ten se váže na lidský CAR a aktivuje cílové geny v lidských primárních hepatocytech, mimo to je schopen posílit příjem koaktivátorů do LBD hCAR, tím, že soutěží s antagonisty. Narozdíl od TCPOBOP pro mCAR jen mírně zvyšuje konstitutivní aktivitu hCAR, a to méně než dvakrát. Vzhledem k tomu, že CITCO je schopen aktivovat také lidský PXR, je možné jej považovat za nespecifický.<sup>4</sup>

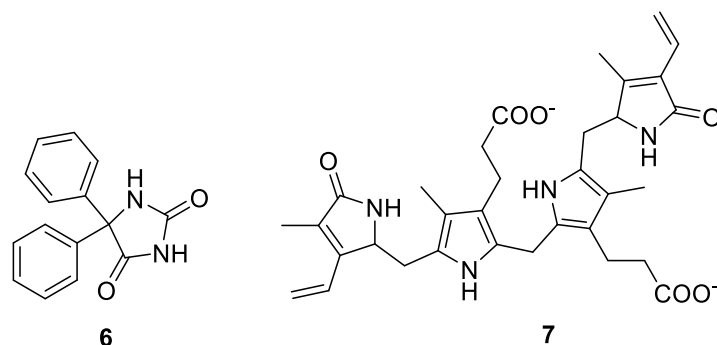
Tím je potvrzena již zmíněná druhová selektivita ve vazebných a aktivačních profilech ligandů, která je předpokládána zejména náhradou threoninu v úseku LBD lidského receptoru, za methionin nacházející se v myším LBD receptoru.<sup>4</sup>



**Obrázek 6.** CITCO jako přímý agonista hCAR.<sup>19</sup>

V současné době již bylo identifikováno také mnoho nepřímých aktivátorů CAR, zahrnující různá léčiva, chemikálie a endogenní steroidní metabolity.<sup>12</sup>

Aktivátory CAR jsou chemické látky, které jsou schopny aktivovat CAR jiným mechanismem, než je vazba ligandu s LBD. Jejich mechanismus však není doposud zcela podrobně popsán. Typickým příkladem je již zmiňovaný fenobarbital, nebo také fenytoin **6**, či bilirubin **7** (**Obrázek 7**).<sup>4</sup>



**Obrázek 7.** Příklady nepřímých aktivátorů CAR receptoru fenytoin **6** a bilirubin **7**.<sup>4</sup>

Jak již bylo výše uvedeno, vliv na aktivitu CAR receptoru mohou mít i některá další léčiva, která jsou v klinické praxi běžně používaná (**Tabulka 1**).<sup>3</sup> Tím, že CAR může být ovlivněn řadou různorodých klinicky používaných léčiv, může dojít k mnoha vzájemných lékovým interakcím.<sup>9</sup>

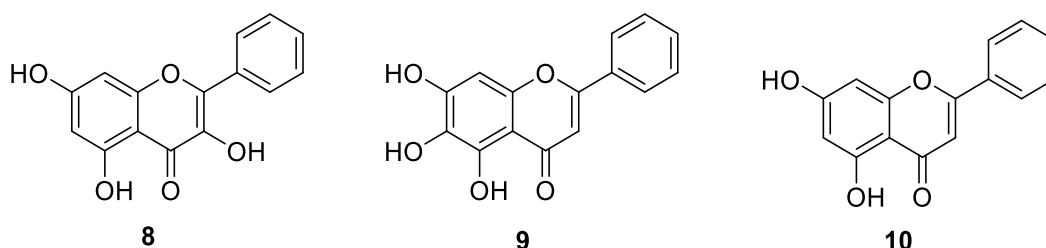
Léčivo	Aktivita CAR
metamizol	lidský aktivátor
metotrexát	myší aktivátor
meklizin	myší aktivátor/lidský inhibitor
ketokonazol	lidský inhibitor
dexamethazon	lidský aktivátor
benzodiazepiny	lidský inhibitor
kokain	lidský inhibitor
valproová kyselina	lidský aktivátor

**Tabulka 1.** Příklady klinicky používaných léčiv ovlivňující CAR receptor.<sup>3</sup>

Mnoho potravin obsahuje také fytochemikálie, jako jsou například flavony nebo katechiny. Rostliny je produkují především pro svou ochranu před tvorbou kyslíkových radikálů, ale také k ochraně před ultrafialovým zářením nebo před napadením cizích organismů. Některé chemické struktury vybraných flavonoidů, jako

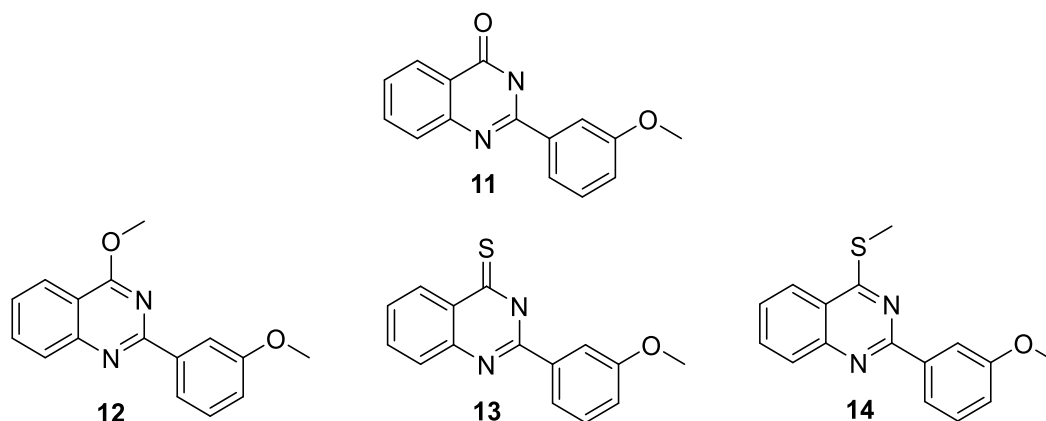


jsou galangin **8**, baicalein **9** a chrysin **10** mohou u lidí díky přijímané potravě snižovat riziko malformací a karcinogeneze během vývoje (**Obrázek 8**). U těchto látek byla také testována jejich schopnost modulovat aktivitu CAR receptoru, přičemž zajímavá aktivita byla pozorována jak u lidského, tak i myšičího CAR receptoru. Je velmi pozoruhodné, že všechny tři zmiňované sloučeniny jsou účinnějšími aktivátory lidského CAR receptoru, než jakým je samotný již zmiňovaný CITCO, který byl původně identifikován jako nejúčinnější aktivátor lidského CAR receptoru.<sup>20</sup>



**Obrázek 8.** Galangin **8**, baicalein **9**, chrysin **10**.<sup>20</sup>

Náhodně provedené testování potenciálních antituberkulotik, různých derivátů chinazolinu, odhalilo jejich možnou schopnost aktivovat lidský CAR receptor. Nejslibnější aktivita byla pozorována u látky 2-(3-methoxyfenyl)-3,4-dihydrochinazolin-4-onu **11**, která byla následně použita jako modelová sloučenina pro přípravu nové skupiny látek k testování CAR aktivity. Další série látek **12**, **13** a **14** (**Obrázek 9**) poskytla ještě větší schopnost aktivace CAR, než jaká byla pozorována u modelové látky **11**, přičemž aktivace byla srovnatelná s již zmíněným prvotním ligandem CITCO.<sup>21</sup>



**Obrázek 9.** Látky odvozené od struktury chinazolinu aktivující lidský CAR receptor.<sup>21</sup>

## 2.1.4 Funkce CAR receptoru

Funkce CAR receptoru a jeho možné potenciální využití je v současné době stále intenzivně zkoumáno. Jeho klíčová role regulátoru xenobiotického a endobiotického metabolismu některých látek je již velmi důkladně popsána, avšak jeho velký potenciál v oblasti metabolismu lipidů, glukózy, pohlavních a thyreoidních hormonů zůstává předmětem výzkumu. Navíc jsou v jeho průběhu neustále objevovány nové možnosti v případném terapeutickém využití. Nejnovější poznatky naznačují také jeho možné protektivní účinky v oblasti jater, ledvin, střev či mozku.<sup>3</sup>

### 2.1.4.1 Detoxikační mechanismy CAR

Živé organismy si v průběhu evoluce vyvinuly řadu obranných mechanismů tak, aby byly schopny zabránit akumulaci toxických xenobiotik a endogenních metabolitů. Jak již bylo zmíněno, CAR je definován jako xenobiotický jaderný receptor, který řídí mnoho jaterních detoxikačních mechanismů vedoucích právě k eliminaci exogenních i endogenních látek.<sup>3, 13</sup> Je schopen přímo regulovat expresi řady enzymů metabolismu I. a II. fáze a také transportérů, které umožňují eliminovat lipofilní látky prostřednictvím biotransformace na více hydrofilní sloučeniny pro usnadnění jejich exkrece.<sup>3</sup>

Charakteristickým znakem první fáze je, že látky podléhající metabolismu mohou získat novou funkční skupinu, jako je například -OH, -SH, -NH<sub>2</sub> nebo -COOH. Ty mohou vznikat prostřednictvím typických reakcí, jako je oxidace (hydroxylace, či deaminace) a redukce, při které dochází k přijetí vodíkových atomů. Kromě těchto reakcí může dojít také k hydrolýze esterových, či amidových vazeb.<sup>5</sup> Tento děj je podmíněn především řízením exprese enzymů I. fáze, jako je CYP2B, CYP3A, CYP2C a CYP2H, které se v hladkém endoplazmatickém retikulu podílejí na tvorbě primárního metabolitu. Za hlavní cílový gen CAR je považován CYP2B6. Ten je sice důležitým enzymem I. fáze metabolismu, ovšem v porovnání s CYP3A4 je jeho schopnost metabolizovat xenobiotika méně významná. Aktivovaný CAR je schopen významně zvýšit expresi také samotného CYP3A4 i přesto, že je jeho hlavním regulátorem PXR receptor.<sup>3, 8</sup>

Druhá fáze metabolismu, odehrávající se v cytoplazmě za pomoci řady enzymů, zahrnuje různé konjugační reakce primárního metabolitu spolu s endogenní

látkou (např. cystein, glycin, glutathion, kyselina glukuronová) tak, aby vznikl hydrofilnější metabolit. Aktivovaný CAR je schopen regulovat enzymy, jako je například uridindifosfátglukuronosyltransferáza UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A10 a UGT2B36) a glutathion-S-transferáza GST (GSTA1 a GSTA2). Jako první cílový gen pro CAR byla identifikována UDP-glukuronyltransferáza UGT1A1. Kromě toho se také CAR významně podílí na regulaci sulfatačních enzymů, takzvaných sulfotransferáz (SULT) a to především zvýšenou expresí SULT1C1, SULT1E1, SULT1A4 a SULT2A1.<sup>8</sup>

Následné studie také poukazují na možnou regulaci transportérů efluxu a vychytávání, jako jsou proteiny mutace mnohočetné lékové rezistence 1 (MDR1), proteiny více lékové rezistence (MRPs) a organické-anion-transportní polypeptidy (OATP), podílející se na závěrečné fázi biotransformace, umožňující vyloučení konjugátů močí, žlučí a případně stolicí.<sup>3</sup>

Aktivace CAR receptoru je všeobecně vnímána velmi přínosně, a to především z hlediska protektivní funkce, bez které by se řada organismů zcela neobešla. Ovšem okolnosti spojené s indukcí detoxikačních enzymů xenobiotik mohou také vést i k nepříznivému ovlivnění organismu a tím k celé řadě možných nežádoucích účinků léčiv a také vzájemným lékovým interakcím, které se mohou projevit buď zvýšenou toxicitou nebo sníženým terapeutickým účinkem léčiv. To je dáno především tím, že CAR indukuje expresi CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, a CYP2C19, které jsou spjaty s metabolismem více než 80 % léčiv.<sup>9</sup> Typickým příkladem je již zmíněné antiepileptikum fenobarbital, který u myšího modelu zapříčinil paracetamolem vyvolanou hepatotoxicitu. To je spojeno právě s indukcí CYP3A a zvýšenou konverzí paracetamolu na jeho toxický metabolit NAPQI.<sup>14</sup> Do osudu metabolismu léčiv, ale i endogenních látek mohou být zapojeny, kromě klinicky využívaných léčiv, také látky vyskytující se běžně v potravě, případně i environmentální kontaminanty životního prostředí právě vlivem aktivace CAR receptoru.<sup>3</sup>

#### *2.1.4.2 CAR jako senzor glukózy a lipidů*

Nedávné studie naznačují, že CAR se spolu s dalšími jadernými receptory a transkripčními faktory podílí na regulaci jaterního metabolismu glukózy a lipidů.<sup>22</sup> Původně byla role CAR v homeostáze glukózy pozorována během klinické studie diabetických pacientů léčených fenobarbitalem.<sup>3</sup> Pacienti vykazovali zvýšenou

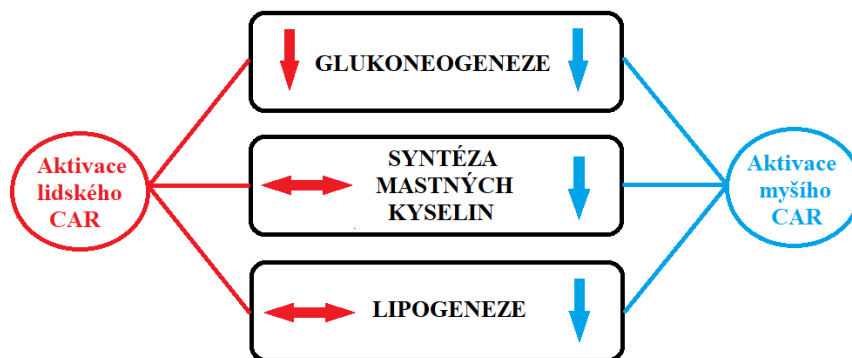
citlivost na inzulín se sníženou hladinou glykémie. Během dalšího experimentu, tentokrát s myším agonistou TCPOBOP, testované myši měly značně zvýšenou toleranci glukózy, která byla způsobena primárně potlačením produkce glukózy v játrech. Aktivovaný CAR tak potlačuje enzymy omezující glukoneogenezi, jako jsou fosfoenolpyruvát karboxykináza (PEPCK) a glukóza-6-fosfatáza (G6Pase).<sup>3</sup>

V regulaci metabolismu lipidů zastává CAR receptor poněkud kontroverzní pohled, neboť dosavadní studie uvádějí jak prolipogenní, tak i antilipogenní funkci. CAR je schopen působit jako antilipogenní faktor tím, že interferuje s PPAR $\alpha$  receptorem a indukuje  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin. U obézních myši podrobených dietě s vysokým obsahem tuků vedla aktivace CAR ke snížení jaterní steatózy inhibicí lipogeneze. Z toho lze usuzovat, že aktivací CAR u zvířecích modelů se mohou významně podílet na regeneraci steatotických jater, a to jednak inhibicí jaterní lipogeneze, tak i indukcí  $\beta$ -oxidace mastných kyselin.<sup>3</sup>

Některé studie však také uvádějí prolipogenní účinek CAR, který indukuje akumulaci jaterních lipidů po jeho aktivaci. K tomu dochází indukcí jaterních lipogenních genů, včetně proteinu 3 obsahujícího *patatin* podobnou fosfolipázovou doménu (PNPLA3), což je gen, jehož polymorfismus je spojen s patogenezí nealkoholických tukových jaterních onemocnění.<sup>3</sup>

Tento protichůdný účinek na metabolismus lipidů je vysvětlován tak, že CAR inhibuje lipogenezi v situaci metabolického stresu vyvolaného dietou s vysokým obsahem tuků, zatímco ji aktivuje v případě, že je chemický stres způsoben přítomností farmakologického agonisty.<sup>3</sup>

Nutné je však opět zdůraznit, že mezi lidským hCAR a myším mCAR receptorem existují výrazné druhové rozdíly v energetickém metabolismu jater. Lidský hCAR je schopen selektivně inhibovat pouze glukoneogenezi bez potlačení syntézy mastných kyselin, zatímco mCAR umožňuje potlačit expresi genů spojených nejen s glukoneogenezí, ale i lipogenezí a syntézou mastných kyselin v myších hepatocytech (**Obrázek 10**).<sup>23</sup>



**Obrázek 10.** Druhové rozdíly v energetickém metabolismu myšího a lidského CAR receptoru.<sup>23</sup>

Stručně lze shrnout, že aktivace CAR významně snižuje hladinu glukózy v séru a zlepšuje glukózovou toleranci a citlivost na inzulín. Analýzy genové exprese a výsledky hyperinzulinemického euglykemického obrazu naznačují, že aktivace CAR působí antihyperglykemizujícím účinkem, tedy potlačením produkce glukózy a stimulací vychytávání glukózy v játrech. Kromě toho aktivace CAR může také výrazně přispět k redukci ztučnění jater, jak inhibicí jaterní lipogeneze, tak indukci  $\beta$ -oxidace. Závěrem lze konstatovat, že aktivace CAR může příznivě ovlivnit diabetes 2. typu a že tyto potenciální účinky CAR naznačují možné terapeutické využití v rámci těchto metabolických onemocnění.<sup>24-25</sup>

#### 2.1.4.3 CAR jako regulátor steroidních a štítných hormonů

Hlavním působištěm katabolismu steroidních hormonů jsou játra, ve kterých CAR hraje důležitou roli prostřednictvím regulace exprese CYP a transferáz. Mnoho cytochromů P450 je zodpovědných za syntézu, katabolismus a inaktivaci steroidních hormonů. Hlavním cílem CAR aktivace je CYP2B a také UGT1A1. Indukcí těchto enzymů vlivem dané aktivace CAR prostřednictvím různých xenobiotik a endobiotik, může vést ke zvýšenému katabolismu steroidních hormonů.<sup>5</sup> Zároveň CAR také reguluje estrogen-sulfotransferázu, katalyzující konjugaci sulfátové skupiny na estrogen a výsledně tak vznikají neaktivní formy hormonů.<sup>26</sup>

První důkaz o zapojení CAR do hormonální regulace byl pozorován již při objevu inverzních agonistů androstanolu a androstenolu, které aktivitu CAR inhibují. Stejně tak tomu bylo pozorováno i u progesteronu a testosteronu.<sup>3</sup> TCPOBOP naopak CAR aktivuje a indukuje tak katabolismus estrogenů a podporuje jeho vylučování.

Hladina endogenních steroidních hormonů v lidském těle je příliš nízká na to, aby ovlivnila samotnou aktivitu CAR receptoru. Ovšem zvýšené koncentrace estrogenů a progesteronů v době těhotenství u žen mohou mít zásadní vliv na glukózovou toleranci a inzulinovou rezistenci indukovanou právě CAR receptorem.<sup>6</sup>

Některé studie také odhalily souvislost mezi aktivitou CAR receptoru a hormony štítné žlázy, a to především v souvislosti s dlouhodobou léčbou fenobarbitalem, která vedla u lidí i potkanů k hypertrofii štítné žlázy. Aktivací CAR pomocí fenobarbitalu a fenytoinu byly sníženy hladiny cirkulujícího tyroxinu (T4) a zároveň byla prokázána regulace katabolismu stresového hormonu kortikosteronu.<sup>3</sup> Předpokládá se, že pokles tyroxinu je způsoben působením enzymů II. fáze UGT1A1 a SULT1A1, které zodpovídají za glukuronidaci a sulfataci thyroidních hormonů pro zajištění jejich clearance a exkrece. Neobjasněnou zajímavostí je, že sérové hladiny celkového aktivního trijodtyroninu (T3) nebyly aktivací CAR vlivem fenobarbitalu, či fenytoinu pozměněny.<sup>5</sup> Naopak u thyrotropních hormonů dochází ke zvýšení jejich sérových hladin. Vlivem jejich zvýšené produkce dochází také k proliferaci folikul štítné žlázy. To může vést až k možnému vzniku nádorového onemocnění, právě vlivem působení nejrůznějších xenobiotik.<sup>27</sup>

#### *2.1.4.4 CAR jako regulátor metabolismu bilirubinu a žlučových kyselin*

Bilirubin je jedna z nejtoxičtějších endogenních látek, která hraje významnou roli v katabolismu a reabsorbci hemu. Lipofilní charakter mu umožňuje přecházet přes hematoencefalitickou membránu a jeho kumulaci v mozku může být vyvolána fatální encefalopatie.<sup>6</sup>

CAR v játrech indukuje detoxikaci a transport bilirubinu, což je jedna z jeho nejvýznamnějších funkcí. Při poruchách tohoto procesu může dojít ke chronické kumulaci bilirubinu a tím k rozvoji žloutenky, která bývá obzvláště pozorována u novorozenců. Řada studií poukazuje na to, že zvýšené hladiny bilirubinu bylo možné snížit účinkem fenobarbitalu, kdy během aktivace CAR byla zvyšována jaterní exprese každé z jeho pěti složek detoxikační dráhy.<sup>28</sup> Častý rozvoj novorozenecké žloutenky může být spjat s relativně nízkými hladinami CAR v játrech novorozenců.<sup>6</sup>

Enzymy zodpovídající za vylučování bilirubinu jsou řízeny prostřednictvím CAR, a přitom samotný bilirubin je zodpovědný za nepřímou aktivaci CAR, tím je umožněna adaptivní odpověď s cílem ochránit organismus před škodlivým vlivem

tohoto metabolitu. Eliminace bilirubinu může být regulována prostřednictvím indukce UGTs a membránových transportérů, které jsou zodpovědné za zvýšenou exkreci tohoto metabolitu.<sup>27</sup> Mimo to mohou být také aktivací CAR indukovány enzymy, které se podílí na biosyntéze hemu.<sup>5</sup> CAR je tak potenciálním cílem pro vývoj nových léků k léčbě novorozeneckých, genetických nebo získaných forem žloutenky.<sup>29</sup>

Významnou funkcí jater je produkce žluči. Změna této funkce může vést k řadě komplikací, včetně hepatálního poškození, či samotné cholestázy.<sup>27</sup> Současné výzkumy poukazují na možné ovlivnění genů zapojených do biosyntézy žlučových kyselin prostřednictvím aktivace CAR receptoru. To by mohlo z farmakologického hlediska představovat významný mechanismus hepatoprotekce během poškození jater vlivem žlučových kyselin.<sup>30</sup> Studie prováděné na myších vedly při aktivaci CAR receptoru k produkci řadě enzymů a transportérů, jednalo se zejména o CYP3A11, SULT2A1, UGT1A1 a MRP2, které se podílejí na eliminaci žlučových kyselin. CAR tak zprostředkovává posun v biosyntéze žlučových kyselin směrem k tvorbě méně toxických žlučových kyselin a také vede ke snížení jejich koncentrací v játrech.<sup>30</sup> Řízením homeostázy žlučových kyselin dochází nepřímou cestou i k normalizaci hladin cholesterolu.<sup>5</sup> U myší, kterým bylo podáváno TCPOBOP, bylo pozorováno zvýšené vylučování žlučových kyselin ve stolici. Dlouhodobá aktivace CAR tak byla spojena se sníženým obsahem cholesterolu v těle a náchylností k ateroskleróze.<sup>31</sup>

#### *2.1.4.5 CAR a jeho funkce v mozku*

V mozku dospělého člověka byla analýzou mRNA detekována exprese CAR, a to zejména v oblastech nucleus accumbens, caudate nucleus a putamen. Ve srovnání s játry a střevem se však jednalo o zcela nižší hladiny exprese, ale i přesto s potenciálně významnou funkcí. Modulace CAR přímo ovlivňuje expresi biotransformačních efluxních transportérů a enzymů, které se podílejí z velké části na neuroprotekcí.<sup>3</sup> Efluxní transportéry řízené prostřednictvím ATP v hematoencefalické bariéře chrání mozek před neurotoxickými látkami a také omezují dodávání léků do mozku. CAR byl indentifikován jako pozitivní regulátor exprese P-glykoproteinu (Abcb1) a proteinu rezistence rakoviny prsu (Abcg2). Jeho aktivace selektivně podněcuje funkci hematoencefalické bariéry zvýšením transportní aktivity a proteinové exprese xenobiotických efluxních pump.<sup>32</sup>

Nádory mozku představují světově nesčetné zdravotní problémy a zároveň poukazují na jedinečnou výzvu konvenční terapie. Kmenové buňky mozkových nádorů jsou schopny udržet svůj růst, odolnost vůči lékům a jisté vlastnosti recidivity.<sup>33</sup> Dosavadní studie odhalují aktivitu agonistů CAR jako je CITCO, který je schopný inhibovat růst a expanzi rakovinných kmenových buněk inhibicí buněčného cyklu s následnou apoptózou, aniž by ovlivnil funkci astrocytů. I přestože přesný molekulární základ antineoplastického účinku zprostředkovaného CAR je intenzivním předmětem zkoumání, výsledky studií naznačují možné použití agonistů k cílení na kmenové buňky mozkových nádorů při léčbě pacientů s gliomem.<sup>3,33</sup>

#### *2.1.4.6 Vliv CAR na zánětlivou střevní reakci*

Současné studie naznačují, že CAR hraje zřejmě také nezanedbatelnou roli při udržování integrity střevní sliznice, zatímco jeho disfunkce může potenciálně přispívat k patogenezi zánětlivých střevních onemocnění.<sup>3</sup> Tyto účinky mohou být zejména cenné při klinické terapii poškozené sliznice spojené se zánětlivým střevním onemocněním, zahrnující například Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu. Ve srovnání se vzorky izolovaných z nezápětlivých prosperujících tkání došlo během zánětlivých střevních onemocnění ke značnému útlumu transkriptu exprese CAR.

Během experimentu, kdy byly ošetřeny poraněné epiteliální monovrstvy selektivním agonistou mCAR CITCO, se významně zlepšilo uzavření střevní epiteliální rány. Tento účinek byl přisuzován zvýšené migraci buněk bez změny buněčné proliferace. Myší CAR agonista TCPOBOP také podpořil zotavování z kolitidy výrazným snížením zánětlivé tkáně a přispěl k celkovému zlepšení sliznice. To se projevilo především sníženými hladinami tkáňové myeloperoxidázy (zánětlivý index infiltrace granulocytů) a sníženým skóre histologického zánětu. V tomto kontextu aktivace CAR může snížit celkový zánět tkáně urychlením opravy a restituce sliznice.<sup>34</sup>

Mimo jiné byla také odhalena souvislost mezi CAR a střevní mikroflórou. Farmakologická aktivace CAR myšího ligandu TCPOBOP ovlivnila složení mikrobiomu včetně snížené regulace bakterií metabolizujících žlučové kyseliny ve střevě. Nedostatek CAR významně modifikoval mikrobiotu, čímž byl zvýšen počet prozánětlivých cytokinů a bakterií. Jeho aktivací může být regulováno složení celkového mikrobiotu, což může mít vliv na samotné zánětlivé procesy.<sup>3</sup>



#### 2.1.4.7 CAR a hepatokarcinogeneze

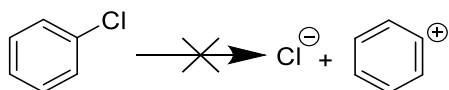
Jak již bylo výše uvedeno, aktivací CAR je indukována jaterní exprese řady detoxikačních enzymů a transportérů. Tím může také dojít k CAR zprostředkované hyperplazii a hepatomegálii jater, přičemž se v tomto případě může jednat o přechodnou a adaptivní reakci na akutní xenobiotický stres. Naopak v případě chronické aktivace CAR může dojít až k hepatokarcinogenezi.<sup>35</sup>

Indukce jaterního tumoru byla poprvé pozorována u experimentu s fenobarbitalem, během kterého u myší CAR<sup>+/+</sup> došlo ke vzniku hepatocelulárního karcinomu případně adenomu, zatímco u myší CAR<sup>-/-</sup> nebyl rozvoj tumoru zjištěn. Během chronické xenobiotické odpovědi je replikace hepatocytové DNA zvýšena, zatímco apoptóza je výrazně utlumena.<sup>35-36</sup> Výsledky studií tak naznačují, že aktivace CAR receptoru je základním podnětem pro rozvoj jaterního nádoru. Tím se CAR může stát užitečným lékovým cílem v prevenci hepatocelulárního karcinomu.<sup>36</sup> Ovšem nutné je zohlednit významné druhové rozdíly mezi aktivitou CAR u zvířecích a lidských modelů. Proto je zapotřebí hlouběji prozkoumat roli aktivace CAR především u lidské rakoviny jater.<sup>37</sup>

## 2.2 Nukleofilní aromatická substituce

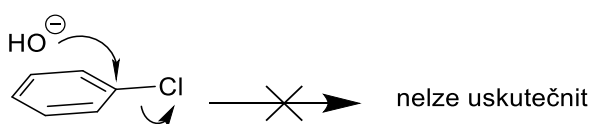
Vzhledem k tomu, že obsahem této práce je příprava potenciálních agonistů myšího CAR receptoru, syntetizovaných prostřednictvím nukleofilní aromatické substituce, je způsob daného mechanismu v následující části této práce podrobně popsán a vysvětlen.

Aromatické substituce probíhají především elektrofilním mechanismem, ovšem v případě halogenovaných aromátů nesoucích ve svém jádře současně také elektron akceptorové substituenty, mohou podléhat právě i reakci jako je nukleofilní aromatická substituce. Tato reakce i přes svou zdánlivě vnější podobnost s nukleofilní substitucí halogenalkanů probíhajících S<sub>N</sub>1 a S<sub>N</sub>2 mechanismem, je zásadně od těchto mechanismů odlišná. Jelikož jsou arenyliové ionty velmi nestabilní, nemohou tak arylhalogenidy podléhat S<sub>N</sub>1 reakcím (**Schéma 1**). Samotná disociace vazby uhlík-halogen je energeticky velmi nevýhodná a v arylhalogenidech k ní dochází jen velmi obtížně.<sup>38-39</sup>



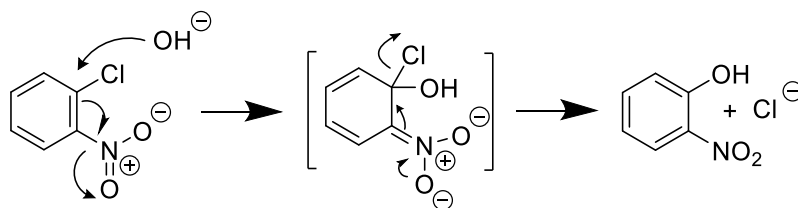
**Schéma 1.** K disociaci nedochází, a proto  $S_N1$ -reakci nelze uskutečnit.<sup>38</sup>

Arylhalogenidy nepodléhají ani  $S_N2$  reakcím, a to z toho důvodu, že atom uhlíku nesoucí halogen je ze sterického hlediska nepřístupný pro atak z opačné strany vůči samotnému halogenu. Nukleofil by musel přistoupit k arylhalogenidu z vnitřní strany aromatického kruhu a zapříčinit tak inverzi celkové aromatické struktury, což z prostorového hlediska není možné (**Schéma 2**).<sup>38</sup>



**Schéma 2.**  $S_N2$ -reakci nelze uskutečnit z prostorového hlediska.<sup>38</sup>

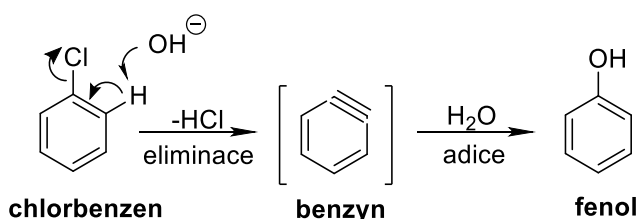
Podstatou nukleofilní aromatické substituce je jednak adičně-eliminační mechanismus, při kterém se v prvním kroku nukleofil aduje na elektronově deficitní uhlík arylhalogenidu za současného vzniku rezonančně stabilizovaného, záporně nabitého intermediátu, nazývaného jako Meisenheimerův adukt. Tento intermediární karbanion ve druhém kroku podléhá eliminaci halogenidového iontu a poskytuje tak výsledný produkt substituce (**Schéma 3**). Adičně-eliminační mechanismus nukleofilní aromatické substituce lze uskutečnit pouze tehdy, jsou-li na aromatickém kruhu vázány elektronakceptorní substituenty v polohách *ortho* nebo *para* vzhledem k odstupující skupině, které umožní rezonanční stabilizaci aniontového intermediátu, zatímco substituenty v polohách *meta* nejsou takové stabilizace schopny. Tento adičně-eliminační mechanismus lze také očekávat u připravovaných látek v experimentální části.<sup>38, 40</sup>



**Schéma 3.** Adičně-eliminační mechanismus nukleofilní aromatické substituce.<sup>38</sup>

Na elektronově deficitním uhlíku aromatického kruhu dochází k nukleofilní adici hydroxidového iontu za vzniku karbaniontového stabilizovaného meziprojektu. Následně intermediární karbanion podléhá eliminaci chloridového iontu a vzniká výsledný produkt substituce.

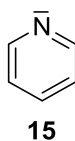
Kromě výše popsaného adičně-elimináčního mechanismu existuje také mechanismus eliminačně-adiční. Tento mechanismus je typický pro halogenbenzeny bez elektronakceptorních substituentů, přičemž reagují především se silnými nukleofily, resp. za vyšších teplot a tlaku. Prvním krokem je eliminační reakce E2, při které silná báze odštěpí HX z daného halogenbenzenu za vzniku meziprojektu označovaného jako benzyn, který je vysoce reaktivní. Ve druhém kroku adicí nukleofilu na již generovaný benzyn vzniká konečný produkt substituce (**Schéma 4**).<sup>38, 40</sup>



**Schéma 4.** Eliminačně-adiční mechanismus nukleofilní aromatické substituce.<sup>38</sup>

### 2.2.1 Šestičlenný heterocyklus pyridinu

Pyridin **15** (**Obrázek 11**) je šestičlenný dusíkatý heterocyklický analog benzenu, který se průmyslově vyrábí destilací černouhelného dehtu. Podobně jako benzen je aromatický s rovinnou molekulovou strukturou, kde každý z pěti uhlíků molekuly přispívá jedním  $\pi$ -elektronem do aromatického sextetu, přičemž  $\text{sp}^2$  hybridizovaný atom dusíku rovněž přispívá jedním  $\pi$ -elektronem a jeho nevázebný elektronový pár není součástí aromatického  $\pi$ -systému.<sup>41</sup>

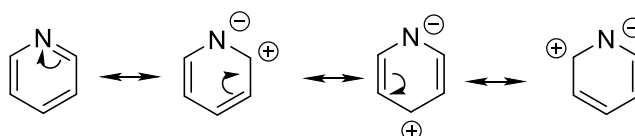


**Obrázek 11.** Šestičlenný heterocyklus pyridinu.<sup>41</sup>

### 2.2.1.1 Reaktivita pyridinu

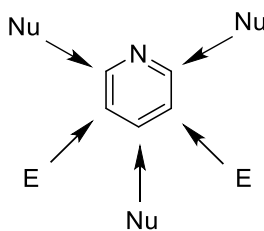
Reaktivita na pyridinovém kruhu se od reaktivity benzenu poněkud odlišuje. Obzvláště elektrofilní aromatická substituce probíhá jen velmi obtížně, například nitrace poskytuje jen velmi malé výtěžky, přičemž halogenaci a sulfonaci lze uskutečnit pouze za velmi drastických podmínek a reakce přednostně vedou do polohy 3., Friedelovy-Craftsovy reakce pak neprobíhají vůbec.<sup>42</sup>

Naproti tomu nukleofilní aromatická substituce derivátů pyridinu substituované halogenem v poloze 2 nebo 4 probíhají velmi snadno, obdobně jako u halogenderivátů benzenu, a to adičně-eliminacním mechanismem. Atom dusíku v tomto šestičlenném heterocyklickém aromatickém systému působí elektron akceptorově. (**Obrázek 12**).<sup>42</sup>



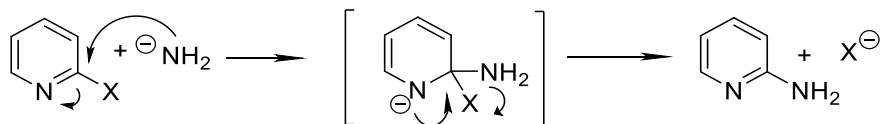
**Obrázek 12.** Resonanční struktura pyridinu.<sup>42</sup>

To má jistý vliv nejen na nukleofilní, ale i elektrofilní substituce. Svým elektronegativním vlivem atomu dusíku, dipólovým momentem a také acidobazickou reakcí mezi bazickým atomem dusíku pyridinu a atakujícím elektrofilem jsou elektrofilní substituční reakce na pyridinu velmi obtížné, a pokud jsou uskutečnitelné jsou směřovány do polohy C3, případně C5. Zatímco nukleofilní substituce na halogenpyridinu probíhají velmi snadno, a to v polohách C4 nebo C2, případně C6 (**Obrázek 13**).<sup>42</sup>



**Obrázek 13.** Reaktivita pyridinu během elektrofilní a nukleofilní substituce.<sup>42</sup>

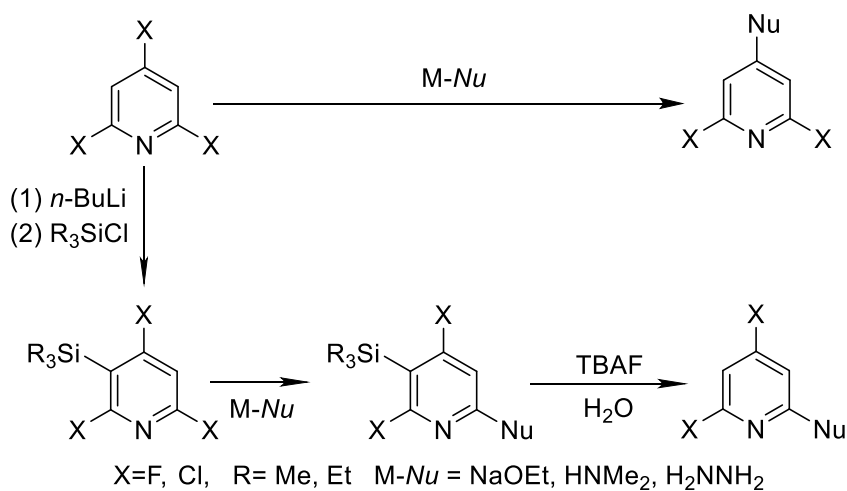
Příklad nukleofilní aromatické substituce na molekule pyridinu je uveden na následujícím schématu (**Schéma 5**).



**Schéma 5.** Nukleofilní aromatická substituce pyridinu.<sup>42</sup>

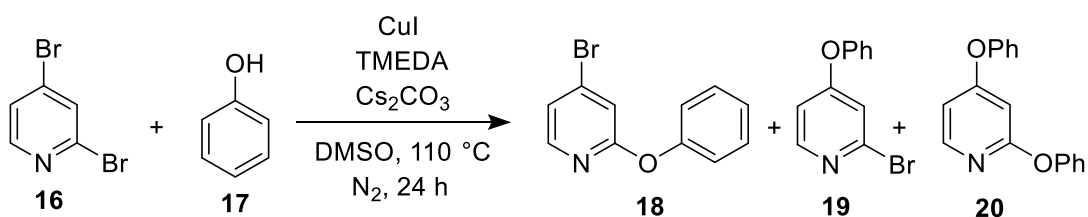
### 2.2.1.2 Regioselektivita pyridinu

Již v minulosti byla velká snaha zajistit regioselektivitu během nukleofilní substituce halogenpyridinů. Jednou z možností, jak ovlivnit regioselektivitu nukleofilní substituce halogenpyridinu, je zavedení jedné nebo více substituovaných silylových skupin do příslušné molekuly. Tento postup představoval prvotní průlom ve snaze o zavedení regioselektivity mezi identické nukleofugy umístěné na C2 a C4, případně C6 pozici halogenpyridinu. Bez ohledu na typ reakce hraje selektivita vždy klíčovou roli. V případě, že je použit vhodný nukleofil, jako je například sekundární amin, hydrazin, ale také ethoxid sodný, je odstupující skupina halogenu přednostně nebo dokonce i výlučně vytěsněna z C4 pozice. K tomu, aby byl daný nukleofug vytěsněn preferenčně z pozice C6, je využíváno právě již zmiňované zavedení 3-trialkylsilylového substituentu, jako je například trimethylsilylová nebo triethylsilylová skupina do polohy C3. Silylový substituent díky svému prostorovému rozložení struktury brání přístupu nukleofilu do poloh C2 a C4, ten pak může interagovat výhradně na C6 uhlíku (**Schéma 6**).<sup>43</sup>



**Schéma 6.** Možné ovlivnění regioselektivity pyridinu prostřednictvím 3-trialkylsilylového substituentu.<sup>43</sup>

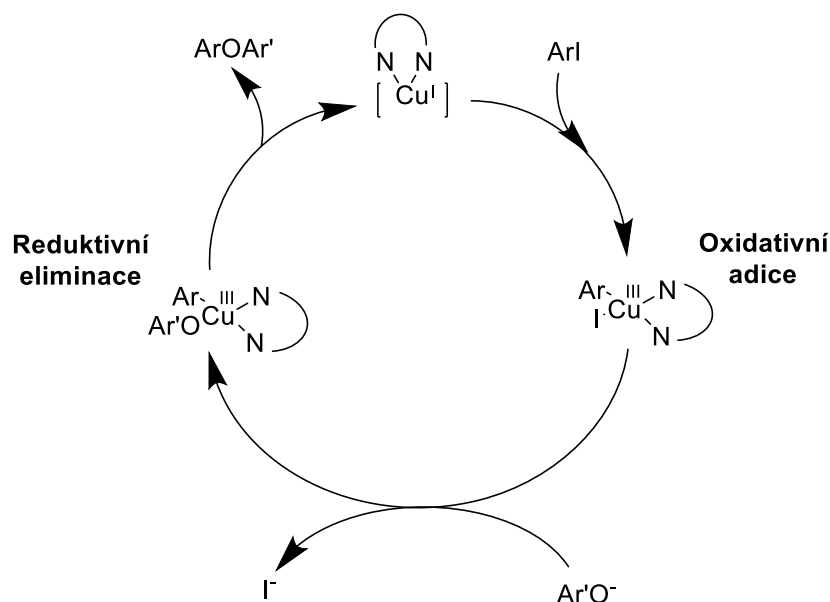
Regioselektivita halogenpyridinu může být dle nejnovějších poznatků katalyzovaná také mědí. Pro optimalizaci reakčních podmínek byla využita couplingová reakce 2,3-dibrompyridinu **16** a fenolu **17**. Nejvýznamnější vliv na průběh reakce měl použitý měďný katalyzátor, v jehož nepřítomnosti byl získán produkt v téměř o polovinu menším výtěžku. Různě použitá rozpouštědla a báze v menší míře taktéž ovlivnily výtěžek dané reakce, ale ne tak dramatickým způsobem jako právě použitý katalyzátor. Optimální reakční podmínky tak byly stanoveny jednoznačně v přítomnosti katalyzátoru CuI/TMEDA a jako nejvhodnější bázi byl stanoven Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v rozpouštědle DMSO, pod dusíkovou atmosférou (**Schéma 7**). V takto zvolených podmínkách byly produkty získány ve velmi dobrých až vysokých výtěžcích s výjimkou při pokusech s *p*-nitrofenolem.<sup>44</sup>



**Schéma 7.** Optimalizace reakčních podmínek mědi katalyzovanou reakcí 2,3-dibromopyridinu **16** a fenolu **17**.

Za takto zvolených podmínek produkt **18** vznikal s 98 % výtěžkem, přičemž vznik vedlejších produktů **19** a **20** nebyl za těchto podmínek vůbec umožněn.<sup>44</sup>

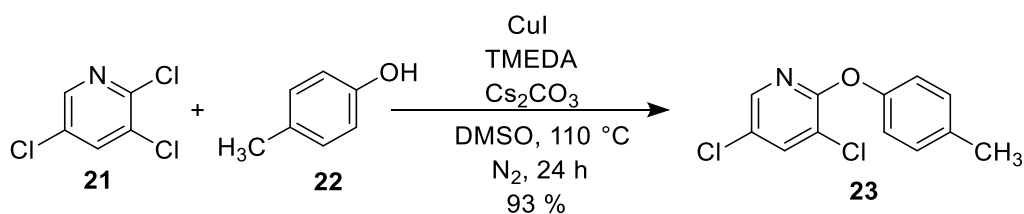
Tato reakce probíhá mechanismem mědi katalyzovaným Ullmannovým couplingem, což je jedna z klíčových reakcí pro tvorbu vazeb uhlík-heteroatom a také uhlík-uhlík.<sup>45</sup> Původní aromatická nukleofilní substituční reakce, kterou vyvinul Fritz Ullmann a Irma Goldbergová vyžadovala stechiometrické množství mědi a velmi vysoké reakční teploty. Nedávné studie odhalily, že účinky relativně levných ligandů, jako jsou například diaminy, aminoalkoholy, diketony či dioly poskytly mnohem výraznější katalytické schopnosti s velmi nízkou spotřebou samotného měďného katalyzátoru. Odhadovaným mechanismem syntézy diaryletherů katalyzovaných Cu<sup>(I)</sup> s *N,N*-chelatačními ligandy je znázorněn pomocí cyklu (**Schéma 8**). Oxidativní adicí přechází jednomocná měď na trojmocnou. Reduktivní eliminací dochází k regeneraci Cu<sup>(I)</sup> a katalytický cyklus se tak může opakovat.<sup>46</sup>



**Schéma 8.** Ullmannův coupling.<sup>46</sup>

### 2.2.1.3 Nukleofilní substituce 2,3,5-trichlorpyridinu

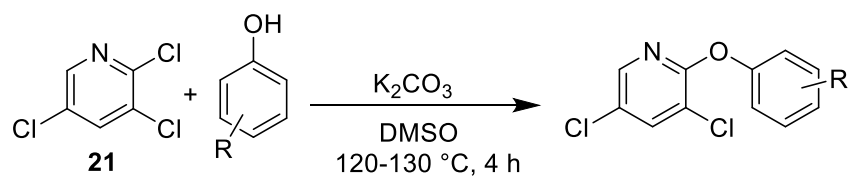
Nukleofilní substituce 2,3,5-trichlorpyridinu **21** s 4-methylfenolem **22** byla uskutečněna také dle výše uvedené optimalizované mědi katalyzované reakce. Výsledný produkt **23** vznikl s velmi vysokým výtěžkem dosahující až 93 % (Schéma 9).<sup>44</sup>



**Schéma 9.** Mědi katalyzovaná reakce 2,3,5-trichlorpyridinu **21** s 4-methylfenolem **22**.<sup>44</sup>

Fujikava a jeho spolupracovníci v rámci syntézy knihovny potenciálních herbicidů připravili skupinu obdobných konjugátů 2,3,5-trichlorpyridinu **21**, a to prostým způsobem bez použití katalyzátoru. 2,3,5-trichlorpyridinu byl společně s různě substituovaným fenolem míchán a zahříván v bezvodém uhličitanu draselném a

v DMSO (**Schéma 10**). Výtěžky připravených derivátů se pohybovaly v rozmezí od 55 % do 62 %. Reakce s 4-nitrofenolem poskytla nejnižší výtěžek, a to pouhých 7 %.<sup>47</sup>



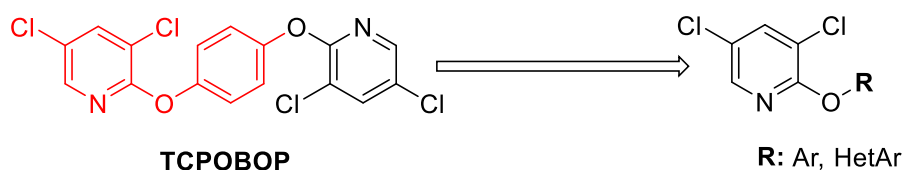
**R:** **3** -H, -Cl, -NO<sub>2</sub> **4** -H, -Cl, -CH<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>

**Schéma 10.** *Syntéza knihovny herbicidů.*<sup>47</sup>



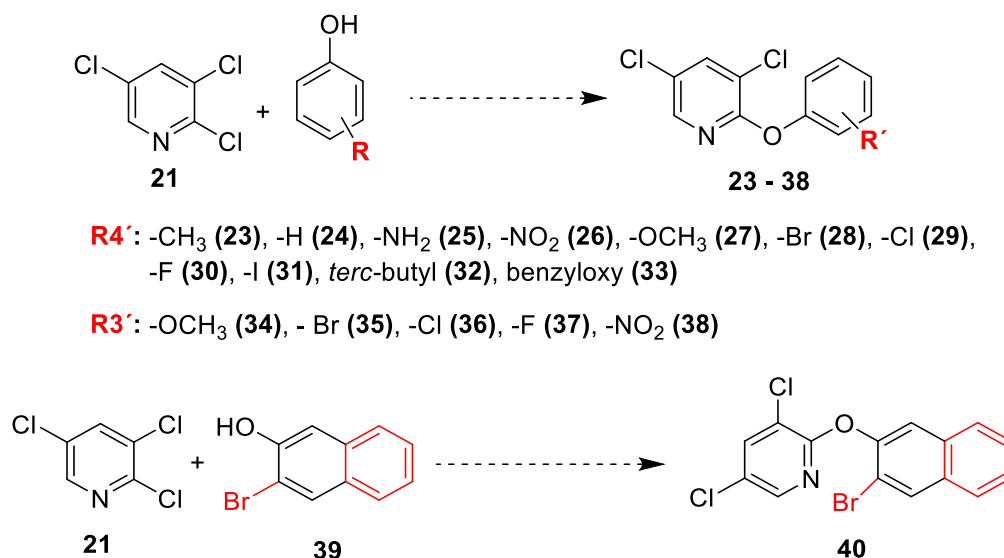
### 3. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo připravit knihovnu strukturně blízkých látek s potenciálním agonistickým účinkem myšího CAR receptoru. Připravované látky jsou odvozeny od prvotní struktury přímého myšího agonisty TCPOBOP, který ve své struktuře zahrnuje celkem tři aromatická jádra, přičemž z toho dvě jádra nesou heteroatom dusíku. Nově syntetizované látky jsou navrženy převážně se dvěma aromatickými jádry (**Obrázek 14**), přičemž jeden z pyridinových heterocyklů předlohové struktury byl vynechán. Připravené deriváty zahrnují elektron-donorové i akceptorové substituenty na připojeném aromatickém cyklu. V některých případech je konjugováno i třetí aromatické jádro, či další aromatický dusíkatý heterocyklus.



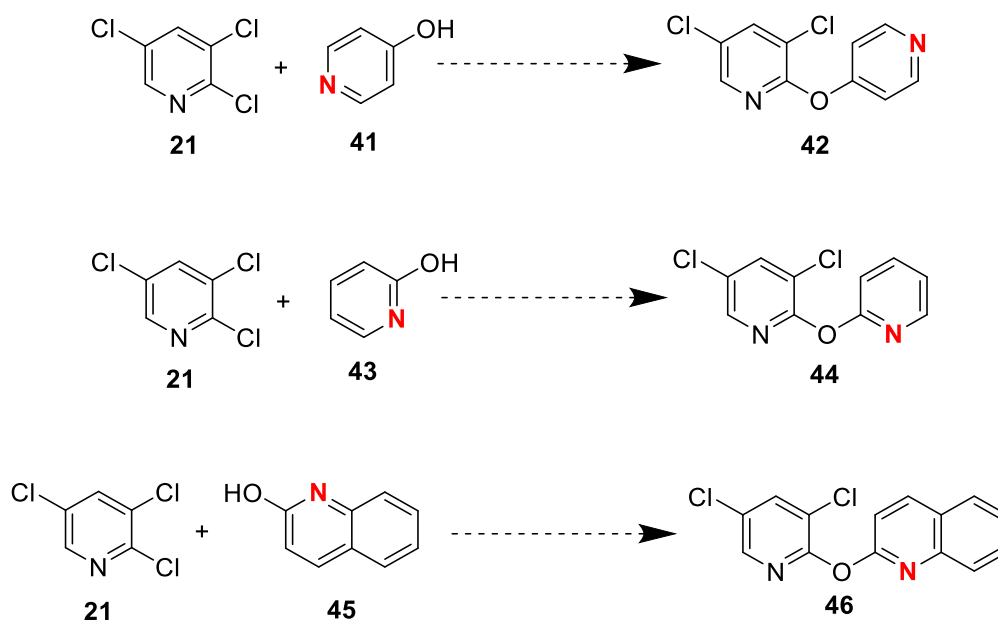
**Obrázek 14.** Obecná struktura (vpravo) připravovaných látek odvozena od přímého myšího agonisty TCPOBOP (vlevo).

Prvním cílem této práce byla syntéza série derivátů připravených prostřednictvím nukleofilní aromatické substituce 2,3,5-trichlorpyridinu s různě substituovanými fenoly převážně v poloze 3' a 4' a to jak akceptorovými, tak i donorovými substituenty (**Schéma 11**), v jednom případě se jednalo o substituovaný naftalen-2-ol.



**Schéma 11.** Návrh výchozích látek a produktů.

Druhým cílem byla syntéza derivátů vycházející z 2,3,5-trichloropyridinu a heteroaromatických látek jako je 4-hydroxypyridin, 2-hydroxypyridin a 2-hydroxychinolin (**Schéma 12**).



**Schéma 12.** Návrh produktů obsahující další heteroaromát.

Veškeré syntetizované látky byly připraveny za účelem sledování vzájemného vztahu mezi strukturou a potenciálním účinkem agonisty na myši CAR receptor.

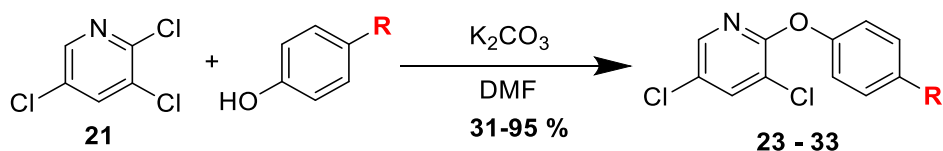
U připravených derivátů byla také testována jejich cytotoxická, antibakteriální, antifungální a antimykobakteriální aktivita.

## 4. VÝSLEDKY S KOMENTÁŘI

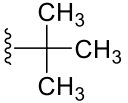
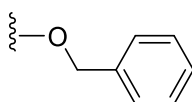
Syntézy byly uskutečněny na základě nukleofilní aromatické substituce. Reakční podmínky připravovaných látek byly převzaty a upraveny ze syntéz fenoxypyridinů publikovaných od Guo a jeho spolupracovníků.<sup>48</sup>

### 4.1 Deriváty 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituované v poloze 4'

Jednotlivé přípravy série syntetizovaných látek vycházely z komerčně dostupného 2,3,5-trichlorpyridinu **21** a různě substituovaného fenolu v poloze 4. Jeden ekvivalent substituovaného fenolu byl rozpuštěn v DMF s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu. Celkem bylo takto připraveno deset derivátů, jejichž struktury byly následně potvrzeny NMR analýzou a hmotnostní spektrometrií (**Schéma 13**). Výtěžky připravované série derivátů 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinů se pohybovaly v rozmezí od 31 % až do 95 % (**Tabulka 2**). Nejnižší výtěžek u této série látek byl zaznamenán u derivátu 3,5-dichlor-2-(4-nitrofenoxy)pyridinu **26**. Výtěžek 31 % byl sice nejnižší, ovšem v porovnání s výše publikovanou syntézou (**Schéma 10**), kdy výtěžek za daných podmínek činil pouhých 7 %, je tento výsledek výrazně lepší. Nejvyšší výtěžky pak byly zaznamenány u látek **24** a **32**, které dosahovaly až 95 %. Doba probíhající reakcí byla velmi rozmanitá, pohybovala se od jednoho dne až po dobu šesti dní, při stejné teplotě 90 °C. Průběh reakce byl kontrolován prostřednictvím TLC. V některých případech byla reakční doba prodloužena z toho důvodu, že retenční faktor připravované látky byl shodný s retenčním faktorem výchozího 2,3,5-trichlorpyridinu.



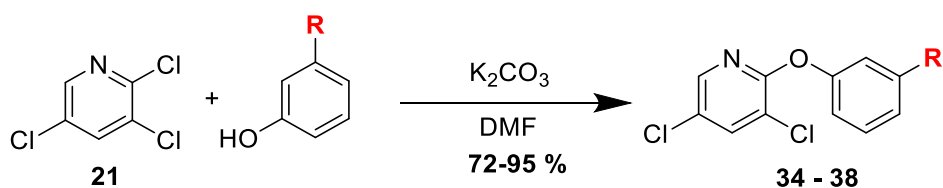
**Schéma 13.** Syntéza derivátů 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituovaných v poloze 4'.

Výchozí fenol	Produkt	R	Čas [h]	Výtěžek (%)
fenol	<b>24</b>	-H	24	<b>95</b>
<i>p</i> -kresol	<b>23</b>	-CH <sub>3</sub>	48	<b>74</b>
4-aminofenol	<b>25</b>	-NH <sub>2</sub>	48	<b>86</b>
4-nitrofenol	<b>26</b>	-NO <sub>2</sub>	144	<b>31</b>
4-methoxyfenol	<b>27</b>	-OCH <sub>3</sub>	96	<b>52</b>
4-bromfenol	<b>28</b>	-Br	48	<b>82</b>
4-chlorfenol	<b>29</b>	-Cl	48	<b>93</b>
4-fluorfenol	<b>30</b>	-F	48	<b>87</b>
4-jodfenol	<b>31</b>	-I	72	<b>66</b>
4- <i>tert</i> -butylfenol	<b>32</b>		144	<b>95</b>
4-(benzyloxy)fenol	<b>33</b>		120	<b>75</b>

**Tabulka 2.** Substituovaný 3,5-dichlor-2-fenoxypyridin v poloze 4'.

## 4.2 Deriváty 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituované v poloze 3'

Syntéza druhé série látek probíhala za obdobných podmínek jako výše připravované látky (**Schéma 14**). Jeden ekvivalent substituovaného fenolu, v tomto případě v poloze 3, byl rozpuštěn v DMF s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a s jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu **21**. Celkem takto bylo připraveno pět derivátů a jejich struktura byla taktéž ověřena NMR analýzou a hmotnostní spektrometrií. Čas průběhu syntézy byl v rozmezí od dvou do čtyř dnů, přičemž aktuální stav reakční směsi byl opět kontrolován TLC a v některých případech byl čas reakce preventivně prodloužen z důvodů shodného retenčního faktoru s výchozí látkou a produktem. U této série derivátů byly získávány průměrně vysoké výtěžky v rozmezí od 72 % až do 95 %, přičemž nejvyšší výtěžek byl u látka **37** (**Tabulka 3**).



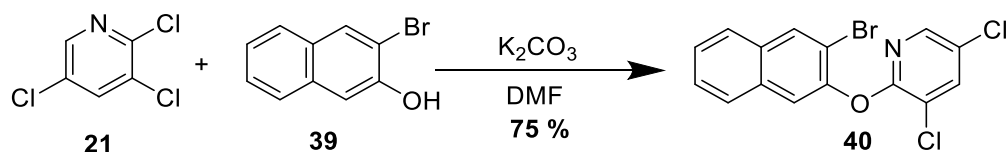
**Schéma 14.** Syntéza derivátů fenoxypyridinů substituovaných v poloze 3'

Výchozí fenol	Produkt	R	Čas [h]	Výtěžek (%)
3-methoxyfenol	<b>34</b>	-OCH <sub>3</sub>	72	<b>92</b>
3-bromfenol	<b>35</b>	-Br	72	<b>72</b>
3-chlorfenol	<b>36</b>	-Cl	48	<b>93</b>
3-fluorfenol	<b>37</b>	-F	96	<b>95</b>
3-nitrofenol	<b>38</b>	-NO <sub>2</sub>	72	<b>89</b>

**Tabulka 3.** Substituovaný 3,5-dichlor-2-fenoxy pyridin v poloze 3'.

### 4.3 Příprava 2-[(3-bromnaftalen-2-yl)]-3,5-dichlorpyridinu

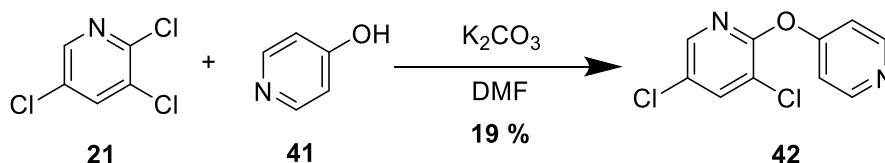
Jeden ekvivalent 3-brom-2-hydroxynaftalenu **39** byl rozpuštěn v DMF s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a s jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu **21** (Schéma 15). Reakce probíhala 2 dny při teplotě 90 °C. Výtěžek připravovaného derivátu 2-[(3-bromnaftalen-2-yl)]-3,5-dichlorpyridinu **40** činil 75 %.



**Schéma 15.** Příprava sloučeniny nesoucí naftylový fragment.

### 4.4 Příprava 3,5-dichlor-2-(pyridin-4-yloxy)pyridinu

Syntéza 3,5-dichlor-2-(pyridin-4-yloxy)pyridinu **42** (Schéma 16) vycházela z komerčně dostupného 4-hydroxypyridinu **41** a 2,3,5-trichlorpyridinu **21**, přičemž jeden ekvivalent 4-hydroxypyridinu byl rozpuštěn v DMF s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a s jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu. I přesto, že reakce probíhala celkem 7 dní při teplotě 90 °C, výtěžek byl pouhých 19 %.



**Schéma 16.** Syntéza sloučeniny s dvěma pyridinovými heterocykly.

#### 4.5 Příprava 3,5-dichlor-2-(pyridin-2-yloxy)pyridinu

Stejným způsobem byl připraven i 3,5-dichlor-2-(pyridin-2-yloxy)pyridin **44** (Schéma 17). Jeden ekvivalent 2-hydroxypyridinu **43** byl rozpuštěn v DMF s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a s jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu **21**. Reakce probíhala celkem 5 dní při teplotě 90 °C. Výtěžek činil pouhých 18 %.

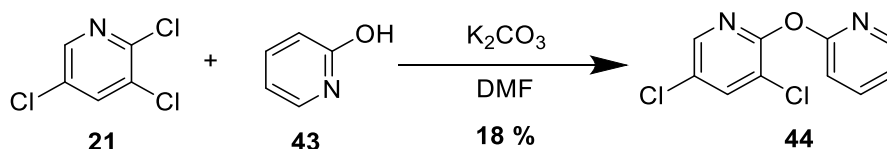


Schéma 17. Syntéza sloučeniny s dvěma pyridinovými heterocykly.

#### 4.6 Příprava 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinolinu

Pro syntézu 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinolinu **46** (Schéma 18) byl použit jeden ekvivalent 2-hydroxychinolinu **45**, který byl rozpuštěn v DMF. Vzhledem k tomu, že předchozí připravované deriváty s heteroatomem dusíku na druhém aromatickém jádře poskytovaly jen velmi nízké výtěžky, byla proto použita silnější báze v podobě hydridu sodného (1,1 ekvivalentu). Poté byl do směsi přidán jeden ekvivalent 2,3,5-trichlorpyridinu **21**. Reakce probíhala po dobu 6 dní při teplotě 90 °C s výtěžkem 15 %.

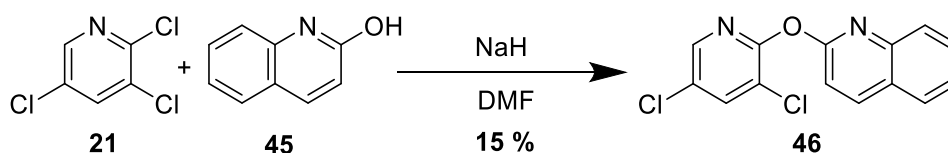


Schéma 18. Příprava produktu nesoucím chinolinový skelet.

## 4.7 Pokusy o přípravu 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]pyrimidinu

Kromě dvaceti výše připravených látek byla také snaha připravit 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]pyrimidin **48** (Schéma 19). Příprava této látky vycházela z 2,3,5-trichlorpyridinu **21** a 2-hydroxypyrimidinu **47**, který byl v několika pokusech rozpuštěn v DMF a v jednom případě bylo rozpouštědlo zaměněno za THF, ve kterém reakce ovšem neprobíhala vůbec. Jako báze bylo v jednom experimentu použito 5 ekvivalentů uhličitanu draselného a v jiných případech bylo využito různých ekvivalentů hydridu sodného. Reakční směs byla vždy míchaná při 90 °C (při reakci v THF za teploty varu rozpouštědla) po dobu 4 až 7 dní. Ani jeden z pokusů při daných reakčních podmínkách nevedl k přípravě požadované látky (Tabulka 4).

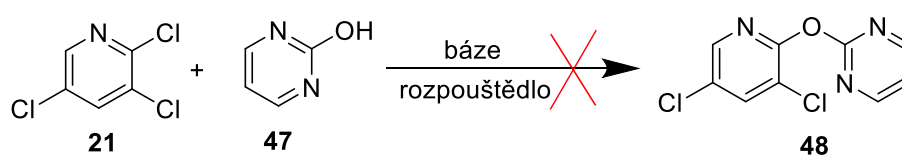


Schéma 19. Pokusy o přípravu derivátu s pyrimidinovým heterocyklem.

Báze	Ekvivalent	Rozpouštědlo	Reakční čas [h]	Látka 48
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5	DMF	96	n/d
NaH	1,1	DMF	144	n/d
NaH	2,1	DMF	168	n/d
NaH	2,2	THF	144	n/d

Tabulka 4. Reakční podmínky syntézy 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]pyrimidinu. (n/d: nedetekováno).

Nicméně reakcí s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a DMF byla namísto očekávané látky izolována látka **49** ve výtěžku 19 %. Reakční směs byla míchána za uvedených podmínek při teplotě 90 °C po dobu 4 dní (Schéma 20).

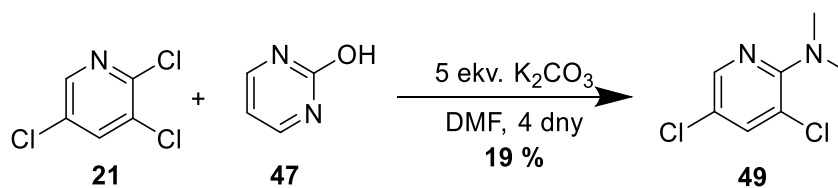
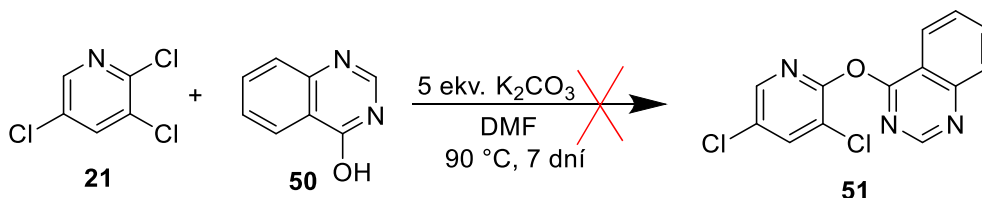


Schéma 20. Izolovaný produkt s dimethylamino skupinou v poloze 2.



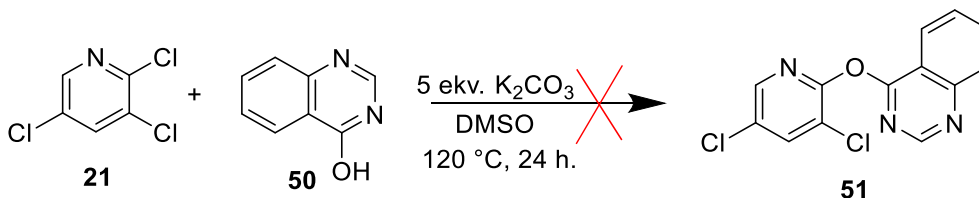
## 4.8 Pokusy o přípravu 4-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinazolinu

Za stejných reakčních podmínek byla snaha připravit také 4-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinazolin **51** (Schéma 21). Jeden ekvivalent výchozí látky 4-hydroxychinazolinu **50** byl rozpuštěn v DMF (5 ml) s pěti ekvivalenty uhličitanu draselného a jedním ekvivalentem 2,3,5-trichlorpyridinu **21**. Reakční směs byla zahřívána při teplotě 90 °C po dobu 7 dní, bohužel ani za takto zvolených podmínek reakce nevedla k žádanému produktu.



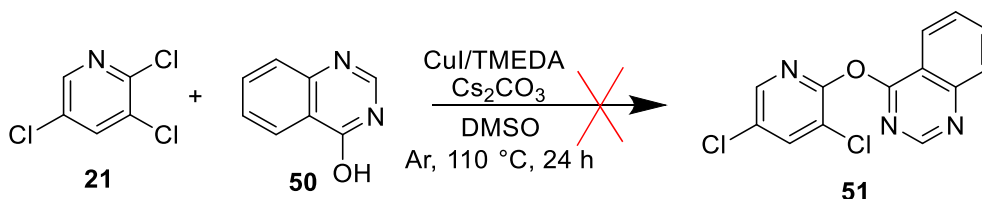
*Schéma 21. Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin I.*

Syntéza látky **51** byla zopakována s tím rozdílem, že bylo použito rozpouštědlo DMSO při teplotě 120 °C. Reakce byla míchána po dobu 24 hodin a ani za takto zvolených podmínek nebylo dosaženo výsledného produktu (Schéma 22).



*Schéma 22. Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin II.*

Dále byl pro přípravu látky **51** vyzkoušen také mědí katalyzovaný Ullmannův coupling (Schéma 23). Pro syntézu byl použit jeden ekvivalent 2,3,5-trichlorpyridinu a 4-hydroxychinazolinu, který byl společně se dvěma ekvivalenty uhličitanu cesného rozpuštěn v DMSO (5 ml). V katalytickém množství byl použit jodid měďný s TMEDA. Reakce byla pod argonem zahřívána na 110 °C po dobu 24 hodin a ani tento způsob nevedl k přípravě látky **51**.



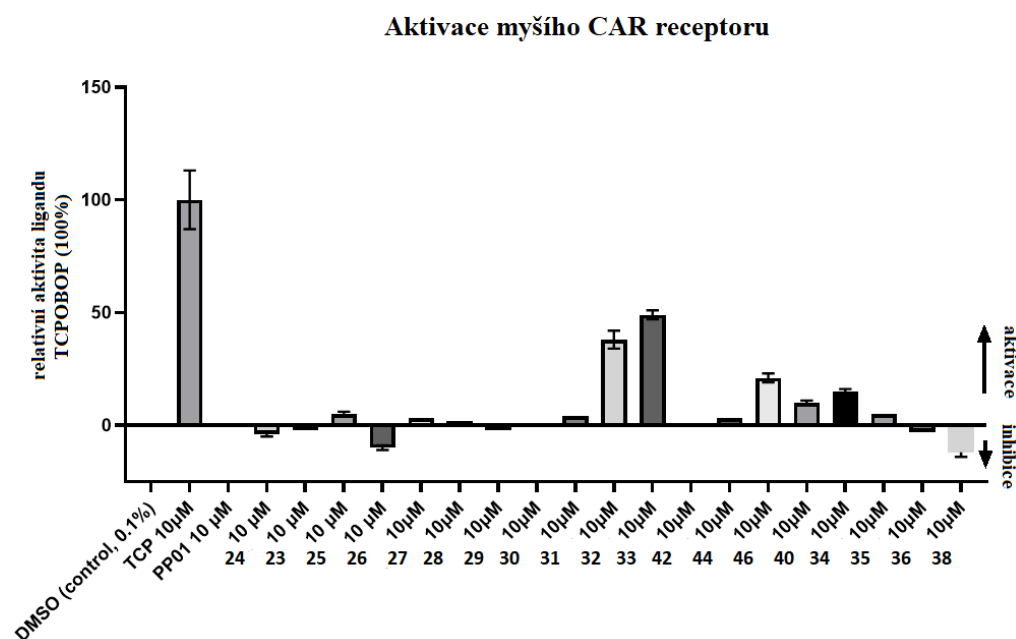
*Schéma 23. Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin III.*

## 4.9 Biologické hodnocení

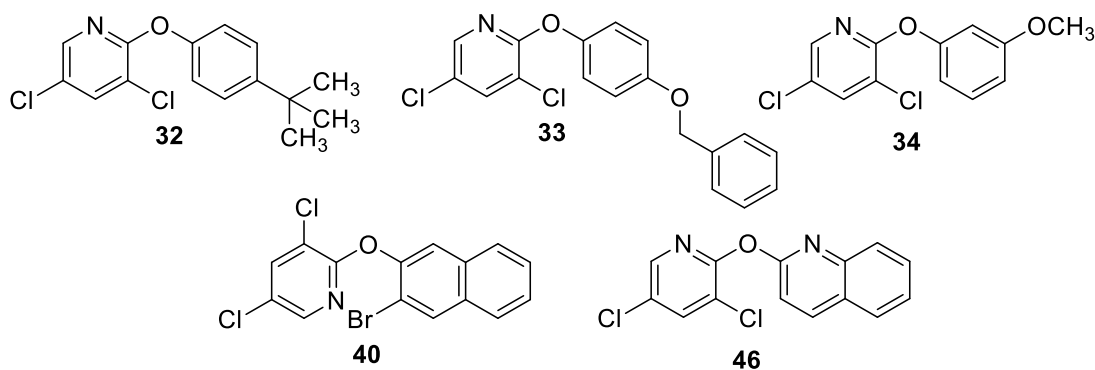
Z výše připravené knihovny látek bylo celkem 19 podrobena biologickému hodnocení potenciální aktivace a inhibice CAR receptoru, a také byla zkoumána cytotoxická aktivita na vybrané buněčné linii na Katedře farmakologie a toxikologie pod vedením prof. PharmDr. Petra Pávka, Ph.D. Dále byly syntetizované látky testovány na Katedře biologických a lékařských věd pod vedením RNDr. Kláry Konečné, Ph.D. na vybrané bakterie, fungální kmeny a mykobakterie.

### 4.9.1 Testování aktivace CAR receptoru

Aktivace a inhibice myšího CAR receptoru byla testována metodou Luciferase Reporter Assay.<sup>49</sup> Data jsou prezentována jako relativní aktivita vůči kontrolnímu vzorku exponovanému vehikulu (v koncentraci 0,1 %). Data a směrodatné odchylky byly získány z jednoho experimentu provedeného v triplikátech. Aktivace větší, než kontrola, značí aktivaci myšího CAR receptoru, zatímco aktivita nižší, nežli kontrola naznačuje inhibici. Nejvýraznější indikovaná aktivita v podobě agonistů byla pozorována u látek **32**, **33**, **34**, **40** a **46**. Naopak látky **24**, **26** a **38** se ukazují být nadějnými inhibitory (**Obrázek 15**).

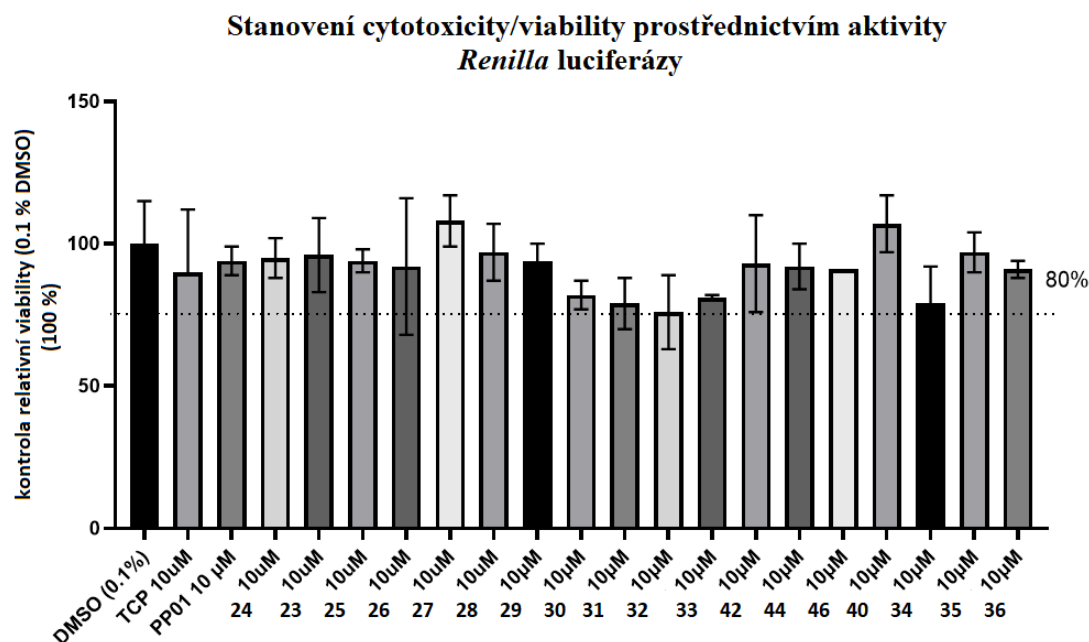


**Obrázek 15.** Aktivace nebo inhibice myšího CAR receptoru metodou Luciferase Reporter Assay.



**Obrázek 16.** Syntetizované látky aktivující CAR receptor.

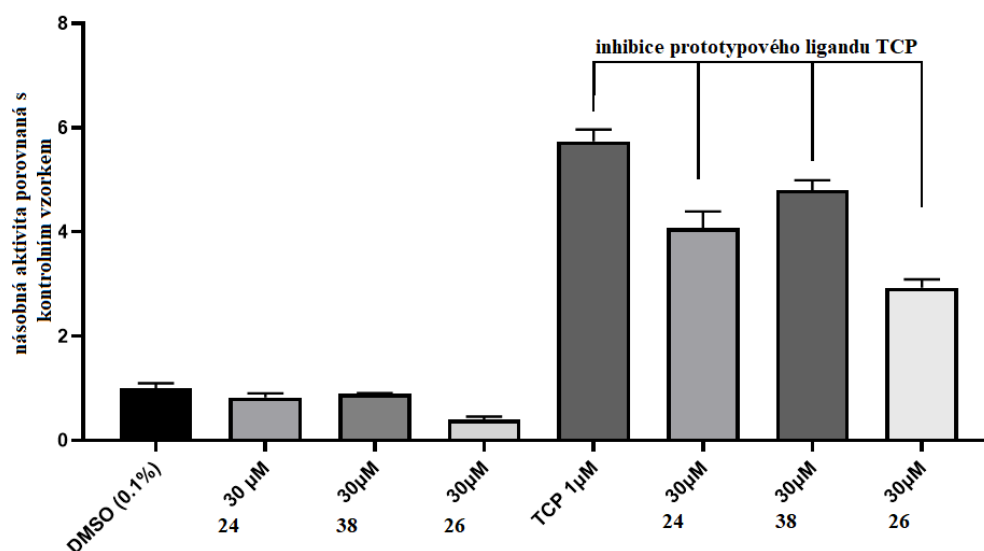
U připravených sloučenin byla také testována cytotoxicita buněk linie HepG2. Buňky byly vystaveny testovaným látkám 24 hodin a poté byla změřena aktivita Renilly luciferázy. Relativní viabilita kontrolního necytotoxického vzorku (vehikulum DMSO, 0,1 %) je pokládána za 100 % a ostatní data jsou vztažena k ní. Interval 80 % značí hranici přijatelné cytotoxicity. Žádná z testovaných látek neprokázala po 24hodinové expozici výraznější cytotoxicitu na buněčné linii HepG2 (**Obrázek 16**).



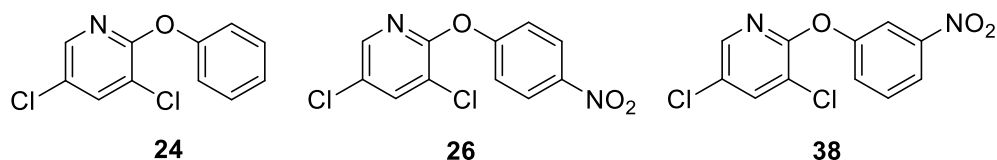
**Obrázek 17.** Účinek testovaných látek na expresi *Renilla* luciferázy značící cytotoxicitu/viabilitu buněk linie HepG2 po 24hodinové expozici.

Látky **24**, **26**, a **38** inhibují myší CAR receptor jak v nepřítomnosti (**Obrázek 15**), tak i v přítomnosti CAR ligandu TCP (**Obrázek 17**). Buňky linie HepG2 byly exponovány současně agonistou myšího CAR receptoru (TCP 1 µM) a

testovaným látkám (**Obrázek 17**). Můžeme tedy konstatovat, že látky **24**, **26** a **38** mají zajímavou biologickou aktivitu, a proto by další syntetické obměny těchto látek měly být zvažovány.



**Obrázek 18.** Inhibice myšního CAR receptoru látkami **24**, **26**, a **38**.



**Obrázek 19.** Syntetizované látky inhibující CAR receptor.

#### 4.9.2 Stanovení bakteriální toxicity

Bakteriální toxicita byla hodnocena prostřednictvím mikrodiluční bujónové metody dle metodiky EUCAST<sup>50</sup> na Katedře biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové. Antibakteriální aktivita je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC – nejnižší koncentrace chemické látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů). Bylo otestováno 16 látek na patogenní i lidskému tělu vlastní kmeny gram pozitivních a gram negativních bakterií – celkem 8 kmenů, které byly získány z Americké typové kultury ATCC, z České sbírky mikroorganismů CCM a z Německé sbírky mikroorganismů DSM (**Tabulka 5**). Zbývající látky **23**, **24**, **35** a **37** nebylo možné hodnotit z důvodu jejich nerozpustnosti v DMSO v požadované koncentraci. Syntetizované látky nevykazovaly zvýšenou bakteriální toxicitu vůči žádnému z použitých kmenů.

BAKTERIÁLNÍ TOXICITA									
Testovaná látka	KMEN (kód)								
MIC/IC <sub>95</sub> ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		SA	MRSA	SE	EF	EC	KP	ACI	PA
<b>25</b>	24h	<b>500</b>	>500	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500
	48h	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500
<b>26</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>27</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>28</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>29</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>30</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>31</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>32</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>33</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>34</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>36</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>38</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>40</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>42</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>44</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>46</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

**Tabulka 5.** Bakteriální toxicita připravených sloučenin.

**SA** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, CCM 4223 **MRSA** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 43300, CCM 4750 **SE** *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, CCM 4418 **EF** *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, CCM 4224 **EC** *Escherichia coli* ATCC 25922, CCM 3954 **KP** *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, CCM 4415 **ACI** *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, DMS 30007 **PA** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, CCM 3955

### 4.9.3 Stanovení antimykotické aktivity

Potenciální toxicita vůči kvasinkám a vláknitým houbám byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou podle metodiky EUCAST.<sup>51-52</sup> Celkem bylo použito 8 kmenů ze sbírky Americké typové kultury a z České sbírky mikroorganismů. Také u tohoto stanovení nebyl prokázán významný účinek vůči použitým kmenům (Tabulka 6-7).

ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA									
Testovaná látka	KMEN (kód)								
MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		CA	CK	CP	CT	AF	AFla	AC	TI
<b>25</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>26</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>27</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>28</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>29</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>30</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>31</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>32</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

**Tabulka 6.** Antimykotická toxicita připravených sloučenin I.

**CA1** *Candida albicans* ATCC 24433, CCM 8320 **CK** *Candida krusei* ATCC 6258, CMM 8271 **CP** *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CCM 8260 **CT** *Candida tropicalis* ATCC 750, CCM 8264 **AF** *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 **AFla** *Aspergillus flavus* CCM 8363 **AC** *Absidia corymbifera* CCM 8077 **TI** *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, CMM 8377

ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA									
Testovaná látka	KMEN (kód)								
MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )		CA1	CK	CP	CT	AF	AFla	AC	TI
<b>33</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>42</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>44</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>46</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>
<b>40</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>34</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>
<b>36</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>38</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

*Tabulka 7. Antimykotická aktivita připravených sloučenin II.*

**CA1** *Candida albicans* ATCC 24433, CCM 8320 **CK** *Candida krusei* ATCC 6258, CMM 8271 **CP** *Candida parapsilosis* ATCC 22019, CCM 8260 **CT** *Candida tropicalis* ATCC 750, CCM 8264 **AF** *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 **AFla** *Aspergillus flavus* CCM 8363 **AC** *Absidia corymbifera* CCM 8077 **TI** *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, CMM 8377

#### 4.9.4 Stanovení mykobakteriální toxicity

U syntetizovaných derivátů byla rovněž testována mykobakteriální toxicita na Katedře biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové. Celkem bylo otestováno 15 látek na vybrané mykobakteriální kmeny. Na základě těchto experimentů byla pozorována aktivita vůči kmenu *Mycobacterium cansasii*.

MYKOBAKTERIÁLNÍ TOXICITA				
Testovaná látka/MIC (µg/mL)	Kmen			
	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M.tbc H37Ra</i>
23	250	125	31,25	250
24	125	250	62,5	250
25	62,5	125	< 3,91	62,5
26	≥ 500	≥ 500	< 3,91	≥ 500
27	≥ 500	31,25	3,91	≥ 500
28	≥ 500	31,25	7,81	≥ 500
29	≥ 500	≥ 500	7,81	≥ 500
30	≥ 500	≥ 500	31,25	≥ 500
31	≥ 500	125	3,91	≥ 500
32	125	62,5	7,81	62,5
33	≥ 500	≥ 500	< 3,91	≥ 500
42	≥ 500	≥ 500	250	≥ 500
44	125	250	62,5	250
46	250	250	3,91	125
40	≥ 500	≥ 500	3,91	≥ 500

**Tabulka 8.** Mykobakteriální toxicita.

*Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366), *Mycobacterium avium* DSM 44156 (DSM18ATCC) a *Mycobacterium kansasii* DSM 44162 (ATCC 12478), *Mtb H37Ra* ITM-M006710 (ATCC 9431)



## 5. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem připravila 20 derivátů pyridinu, které byly odvozeny od předlohy struktury agonisty myšího receptoru CAR TCPOBOP. Syntéza dalších dvou zamýšlených sloučenin nevedla k požadovanému výsledku. Struktura třinácti připravených látek nebyla dosud v odborné literatuře publikována. Reakce probíhala mechanismem nukleofilní aromatické substituce s uspokojivými výtěžky.

Z výsledků biologického hodnocení na myších CAR receptorech vyplynulo, že připravené deriváty v porovnání s molekulou TCPOBOP jeví látky pouze slabší agonistickou aktivitu vůči myšímu CAR receptoru. Jednalo se především o látky nesoucí objemný substituent v poloze 4' a také molekuly zahrnující tři aromatická jádra. Ovšem v případě sloučenin nesoucí v poloze 3', popřípadě 4' u fenylu vázaným na pyridin nitro skupinu, došlo ke zjištění inhibiční aktivity na zmíněný receptor.

Látky byly testovány také na případnou aktivitu vůči buněčné linii HepG2, také proti vybraným bakteriálním, fungálním a mykobakteriálním kmenům, kdy látky vykazovaly pouze účinek vůči *Mycobacterium cansasii*.

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Obecné postupy použité při separaci a charakterizaci látek

Výchozí použité látky a rozpouštědla byly zakoupeny od firmy Sigma-Adrich, výjimkou byl použitý *p*-kresol, který byl zakoupen od firmy Merck a 4-aminofenol původem od firmy BDH. Uhlíčan draselný byl zakoupen od firmy Lachema. Všechny látky byly použity ve svém původním stavu bez čištění.

#### Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

Průběh reakce a čistota produktů v této práci byly průběžně kontrolovány a sledovány pomocí tenkvrstvé chromatografie, během které byly používány aluminiové TLC desky Silica gel 60 F<sub>254</sub> od firmy Merck. Použitá mobilní fáze byla vybrána v závislosti na analyzovaných sloučeninách. Ve většině případů se jednalo o směs rozpouštědel hexan/ethyl-acetát. K detekci daných látek byla použita UV lampa při vlnové délce 254 nm.

#### Sloupcová chromatografie

K purifikaci připravovaných látek byla použita sloupcová chromatografie. Jako stacionární fáze byl použit silikagel 60 (0,040-0,063 mm), který byl zakoupený od firmy Merck. Mobilní fází byl ve většině případů čistý hexan, jen v některých případech byla polarita mobilní fáze zvyšována kombinací rozpouštědel hexan/ethyl-acetát.

#### Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR spektra byla měřena v CDCl<sub>3</sub> na přístroji VARIAN VNMR S500 a Jeol JNM-ECZ600R. Chemické posuny byly nepřímo vztaženy ke standardu tetramethylsilanu pomocí zbytkového signálu rozpouštědla (7.26 ppm pro <sup>1</sup>H a 77.0 ppm pro <sup>13</sup>C). Chemické posuny pak byly změřeny jako hodnoty δ (ppm). Data jsou prezentována v následujícím pořadí: chemický posun (δ), multiplicita (s: singlet, d: dublet, m: multiplet, brs: broad singlet), interakční konstanta (Hz) a integrovaná intenzita (v protonových spektrech).

### **Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Hmotnostní spektra s nízkým rozlišením (LRMS) byla změřena na hmotnostním spektrometru Compact mass spectrometer od společnosti Advion's za využití metody chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

### **Infračervená spektroskopie (IČ)**

Infračervená spektroskopie byla měřena na přístroji NICOLET 6700 FT-IR metodou jednodrazové zeslabené úplné reflektance (ATR) s krystalem ZnSe, Ge nebo C.

### **Stanovení teploty tání**

Teploty tání všech látek byly měřeny prostřednictvím přístroje STUART SMP30, přičemž nebyly korigovány.

## 6.2 Obecné metody použité při biologickém hodnocení

### 6.2.1 Metoda Luciferase Reporter Assay

Buňky linie HepG2 byly kultivovány na 48 jamkových plátech. Po 24 hodinách byly transfekovány reagentem Lipofectamin 3000<sup>TM</sup> reportérovým vektorem p2B6-luc, expresními vektory pro myši CAR receptor a Renilla luciferázu (pRL-TK). Poté byly buňky exponovány na 24 hodin testovaným látkám nebo modelovému ligandu TCP (1,4-bis[2-(3,5-dichlorpyridyloxy)]benzen) v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci. Po dalších 24 hodinách byla Renilla luciferáza detekována Dual reportérovým kitem od firmy Promega.<sup>49</sup>

### 6.2.2 Mikrodiluční bujónový test

Bakteriální toxicita (stanovení MIC v  $\mu\text{M}$ ) byla hodnocena pomocí mikrodiluční bujónové metody podle pokynů EUCAST<sup>50</sup> (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Referenční kmeny byly použity ze sbírky americké typové kultury (ATCC - American Type Culture Collection, 8 kmenů), z České sbírky mikroorganismů (CCM - Czech Collection of Microorganisms, 7 kmenů) a z Německé sbírky mikroorganismů (DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, 1 kmen). Kultivace byla provedena v Mueller-Hintonově bujónu (CAMHB, Sigma-Aldrich) při teplotě  $35 \pm 2$  °C a pH 7,0. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich) za vzniku zásobních roztoků, které byly zředěny CAMHB na konečné koncentrace (s ohledem na jejich mez rozpustnosti) 2000 – 1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,612 – 7,88 – 3,9 – 1,953 – 0,977 – 0,488  $\mu\text{M}$ . Do každého testu byly zapojeny pozitivní kontroly (kultivační médium naočkované bakteriemi), negativní kontroly (testování sterilního média) a interní standardy kvality (gentamycin, ciprofloxacin – oba od Sigma-Aldrich). Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesáhla 2,5 % (v/v) celkového složení roztoku a neovlivnila tak růst bakterií. Antibakteriální aktivita je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) po 24 a 48 hodinách statické inkubace ve tmě a v humidní atmosféře. Jako vizuální kontrola a indikátor metabolické aktivity pro hodnocení koncového bodu MIC byl použit AlamarBlue<sup>53</sup> (ThermoFisher Scientific).

Toxicita na vybraných liniích kvasinek a vláknitých hub (stanovení MIC v  $\mu\text{M}$ ) byla také hodnocena pomocí mikrodiluční bujónovou metodou podle standardů EUCAST.<sup>51-52</sup> Referenční kmeny byly použity ze sbírky americké typové kultury (ATCC, 6 kmenů) a z České sbírky mikroorganismů (CCM, 7 kmenů). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a následně byly zředěny médiem RPMI 1640 s glutaminem a doplněny glukózou (2 %) a pufrem (kyselina 3-morfolinopropan-1-sulfonová) na pH 7,0 (vše od Sigma-Aldrich). Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 2,5 % (v/v) celkového složení roztoku a bylo potvrzeno, že tato koncentrace neinhibuje růst testovaných hub. Statická inkubace byla prováděna v temné a humidní atmosféře při  $35\pm 2$  °C po dobu 24 a 48 hodin (72 a 120 hodin pro *Trichophyton interdigitale*, v daném pořadí). Zahrnuty byly pozitivní i negativní kontroly a interní kontroly kvality a standardy (flukonazol a amfotericin B, oba jsou od Sigma-Aldrich). Hodnoty MIC definované jako koncentrace prokazující, že naměřená absorbance je stejná nebo nižší než u kontroly. Jako vizuální kontrola a indikátor metabolické aktivity byl použit opět AlamarBlue<sup>53</sup> (ThermoFisher Scientific).

Potenciální aktivita na mykobakteriální kmeny byla stanovena rovněž mikrodiluční bujónovou metodou dle standardů EUCAST. Antimykobakteriální test byl proveden s kmeny *Mycolicibacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366), *Mycobacterium avium* DSM 44156 (DSM18ATCC) a *Mycobacterium kansasii* DSM 44162 (ATCC 12478) z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo) a s avirulentním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) z belgických koordinovaných sbírek mikroorganismů (Antverpy, Belgie). Jako kultivační médium byl použit Middlebrook 7H9 bujón (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % Middlebrook OADC růstový doplněk (Himedia, Mumbai, Indie).<sup>53-54</sup>

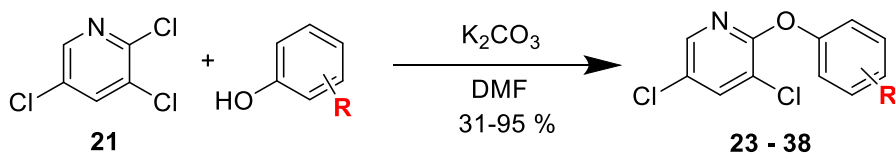
Konečná hustota byla upravena na 1,0 na McFarlandově stupnici a zředěna v poměru buď 1:20 (pro rychle rostoucí mykobakterie) nebo 1:10 (pro pomalu rostoucí mykobakterie) s bujónem. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), poté byl přidán Middlebrookův 7H9 bujón, aby se získala koncentrace 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Standardy používané pro stanovení aktivity byly

INH, RIF a CPX (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Konečné koncentrace byly nastaveny jako 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledná koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst žádného z kmenů. Zahrnuty byly pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontroly růstu. Destičky obsahující pomalu rostoucí mykobakterie byly uzavřeny polyesterovým adhezivním filmem a inkubovány ve tmě při 37 °C bez míchání. Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnota byla odečtena na základě změny barvy skvrny (modrá barva-aktivní sloučenina; růžová barva-inaktivní sloučenina). Všechny experimenty byly provedeny duplicitně.

## 6.3 Syntéza a charakterizace látek

### 6.3.1 Provedení syntéz 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinů

Syntéza první série připravovaných látek (**Schéma 24**) vycházela z komerčně dostupného 2,3,5-trichlorpyridinu a různě substituovaného fenolu v poloze 3' a 4'. Jeden ekvivalent substituovaného fenolu byl vždy navážen do baňky a rozpuštěn v DMF (5 ml). Následně bylo k daným látkám přidáno pět ekvivalentů uhličitanu draselného a na závěr byl přidán jeden ekvivalent 2,3,5-trichlorpyridinu (**21**). Reakční směs byla míchána při teplotě 90 °C a poté byla zpracována extrakcí. Směs byla vytřepána mezi ethyl-acetát (20 ml) a nasycený roztok síranu měďnatého (20 ml). Organická fáze byla dále vytřepána s vodou (20 ml) a po oddělení byla vysušena bezvodým síranem sodným. Následovala filtrace a odpaření rozpouštědla. Látky byly purifikovány sloupcovou chromatografií. Celkem bylo tímto způsobem připraveno šestnáct derivátů, přičemž výtěžky syntéz se pohybovaly v rozmezí od 31 % do 95 %.



**R4'**: -H (**24**), -CH<sub>3</sub> (**23**), -NH<sub>2</sub> (**25**), -NO<sub>2</sub> (**26**), -OCH<sub>3</sub> (**27**), -Br (**28**), -Cl (**29**), -F (**30**), -I (**31**), *tert*-butyl (**32**), benzyloxy (**33**)

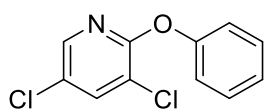
**R3'**: -OCH<sub>3</sub> (**34**), -Br (**35**), -Cl (**36**), -F (**37**), -NO<sub>2</sub> (**38**)

*Schéma 24. Syntéza první série sloučenin.*

### **3,5-Dichlor-2-fenoxypyridin (24)**<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molární hmotnost: 240,08 g.mol<sup>-1</sup>

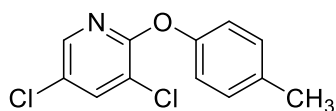


**Fenol** (524,5 mg; 5,573 mmol), **2,3,5-trichloropyridin** (1,017 g; 5,573 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (3,851 g; 27,865 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 24 hodin. **Sloupcová chromatografie:** hexan, zpolárněno na hexan:EtOAc (9:1). **Výtěžek:** 1,268 g (95 %). Bílá krystalická látka. **T.t.** 154-155 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.99 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.48-7.41 (m, 2H), 7.31 – 7.23 (m, 1H), 7.18-7.14 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.6, 153.3, 143.5, 138.8, 129.6, 125.5, 125.4, 121.3, 119.5. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 240,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 241,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 1568, 1492, 1427, 1383, 1282, 1245, 1194, 1161, 1125, 1062, 1022. **Rf:** 0,84 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### **3,5-Dichlor-2-(4-methylfenoxy)pyridin (23)**<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molární hmotnost: 254,11 g.mol<sup>-1</sup>



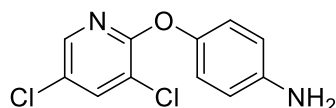
***p*-Kresol** (762,9 mg; 7,055 mmol), **2,3,5-trichloropyridin** (1,287 g; 7,055 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (4,875 g; 35,275 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 48 hodin. **Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,327 g (74 %). Nažloutlá olejovitá látka. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.21 – 7.27 (m, AA', BB', 2H), 7.01 – 7.06 (m, AA', BB', 2H), 2.39 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.9, 150.9, 143.5, 138.6, 135.0, 130.8, 125.2, 121.2, 119.3, 20.89. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 254,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 255,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 1572, 1506, 1427, 1382, 1283, 1245, 1196, 1164, 1124, 1110, 1062, 1018. **Rf:** 0,68 (hexan/ethyl-acetát 1:1).



### 3,5-Dichlor-2-(4-aminofenoxy)pyridin (25)<sup>55</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Molární hmotnost: 255,10 g.mol<sup>-1</sup>



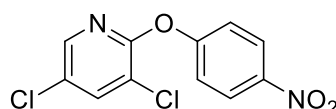
*p*-Aminofenol (608,1 mg; 5,572 mmol),  
2,3,5-trichlorpyridin (1,016 g; 5,572 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
(3,850 g; 27,862 mmol), DMF (5 ml), Čas: 48 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek** 1,226 g (86 %). Světle hnědá krystalická látka. **T.t.** 65,5-68,5 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.98 – 6.92 (m, AA', BB', 2H), 6.74 – 6.69 (m, AA', BB', 2H), 3.67 (brs, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.2, 145.1, 143.9, 143.4, 138.5, 124.9, 122.3, 119.0, 115.9. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 255,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 256,9 (70). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3335, 2926, 1625, 1574, 1508, 1427, 1382, 1244, 1191, 1124, 1109, 1062. **Rf:** 0,40 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(4-nitrofenoxy)pyridin (26)<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molární hmotnost: 285,08 g.mol<sup>-1</sup>



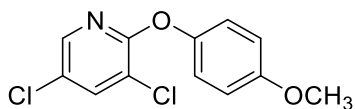
*p*-Nitrofenol (540,7 mg; 3,887 mmol),  
2,3,5-trichlorpyridin (709,1 mg; 3,887 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
(2,686 g; 19,435 mmol), DMF (5 ml), Čas: 144 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 343,5 mg (31 %). Bílá krystalická látka. **T.t.** 108,8-109,0 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.37 – 8.24 (m, AA', BB', 2H), 8.02 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.36 – 7.25 (m, AA', BB', 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.4, 156.3, 144.7, 143.6, 139.4, 127.2, 125.5, 121.3, 120.2. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 285,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 286,9 (70). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3116, 3072, 2926, 2855, 1567, 1511, 1490, 1429, 1380, 1348, 1300, 1284, 1254, 1232, 1213, 1167, 1113, 1064. **Rf:** 0,54 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(4-methoxyfenoxy)pyridin (27)

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Molární hmotnost: 270,11 g.mol<sup>-1</sup>



**4-Methoxyfenol** (541,8 mg; 4,364 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (796,1 mg; 4,364 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(3,016 g; 21,820 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 96 hodin.

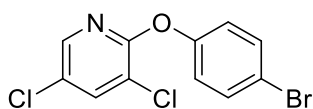
**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 613,7 mg (52 %). Bílá amorfnní látka.

**T.t.** 65,5-66,0 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.14 – 7.10 (m, AA', BB', 2H), 6.98 – 6.93 (m, AA', BB', 2H), 3.83 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.8, 156.7, 146.3, 143.1, 138.4, 124.9, 122.2, 118.9, 114.4, 55.2. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 270,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 271,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3066, 3000, 2934, 2835, 1574, 1508, 1434, 1388, 1302, 1294, 1237, 1211, 1190, 1061, 1038. **Rf:** 0,48 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(4-bromfenoxy)pyridin (28)

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>BrCl<sub>2</sub>NO

Molární hmotnost: 318,98 g.mol<sup>-1</sup>



**4-Bromfenol** (772,0 mg; 4,462 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (814,0 mg; 4,462 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(3,084 g; 22,310 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 48 hodin.

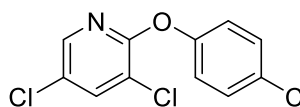
**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,160 g (82 %). Bílá krystalická látka.

**T.t.** 71,2-71,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.56 – 7.52 (m, AA', BB', 2H), 7.08 – 7.02 (m, AA', BB', 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.2, 152.3, 143.4, 138.9, 132.7, 125.9, 123.8, 119.5, 118.4. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 319,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 317,9 (60). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3073, 2929, 1568, 1481, 1460, 1429, 1401, 1382, 1299, 1288, 1252, 1234, 1202, 1165, 1064, 1060, 1012. **Rf:** 0,68 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### **3,5-Dichlor-2-(4-chlorfenoxy)pyridin (29)**<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>NO

Molární hmotnost: 274,53 g.mol<sup>-1</sup>



**4-Chlorfenol** (531,2 mg; 4,132 mmol),

**2,3,5-trichlorpyridin** (753,8 mg; 4,132 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

(2,855 g; 20,660 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 48 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,058 g (93 %). Bílá krystalická látka.

**T.t.** 96,0-96,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.43 – 7.36 (m, AA', BB', 2H), 7.15 – 7.05 (m, AA', BB', 2H).

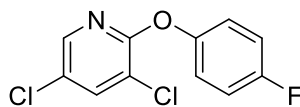
**<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.3, 151.7, 143.4, 138.9, 130.7, 129.7, 125.9, 122.8, 119.5. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 273,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 275,8 (95).

**IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3076, 1486, 1462, 1429, 1405, 1383, 1288, 1253, 1202, 1163, 1127, 1088, 1060, 1015. **Rf:** 0,61 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### **3,5-Dichlor-2-(4-fluorfenoxy)pyridin (30)**

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>FNO

Molární hmotnost: 258,07 g.mol<sup>-1</sup>



**4-Fluorfenol** (510,6 mg; 4,555 mmol),

**2,3,5-trichlorpyridin** (831,0 mg; 4,555 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**

(3,148 g; 22,775 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 48 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,025 g (87 %). Bílá krystalická látka

**T.t.** 93,5-93,7 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.14 – 7.11 (m, 4H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.94 (d,

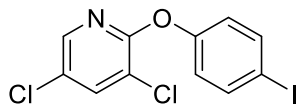
*J* = 244.0 Hz), 157.59, 148.91 (d, *J* = 2.8 Hz), 143.39, 138.85, 125.66, 122.91 (d, *J* = 8.4 Hz), 119.33, 116.30 (d, *J* = 23.4 Hz). **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita):

257,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 259,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 2928, 2856, 1748, 1499, 1429, 1384, 1237, 1224, 1179, 1091, 1060. **Rf:** 0,71 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(4-jodfenoxy)pyridin (31)

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>INO

Molární hmotnost: 365,98 g.mol<sup>-1</sup>



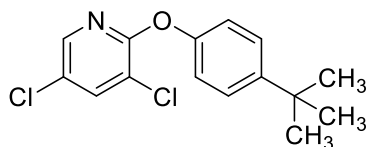
**4-Jodfenol** (519,9 mg; 2,363 mmol), **2,3,5-trichlorpyridin** (431,1 mg; 2,363 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (1,633 g; 11,815 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 72 hodin. **Sloupcová chromatografie:**

hexan. **Výtěžek:** 573,8 mg (66 %). Bílá krystalická látka. **T.t.** 70,2-70,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.76 – 7.71 (m, AA', BB', 2H), 6.96 – 6.92 (m, AA', BB', 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.2, 153.1, 143.5, 139.0, 138.7, 126.0, 123.7, 119.6, 89.2. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 366,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 367,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 2805, 1571, 1479, 1456, 1431, 1382, 1302, 1288, 1251, 1203, 1055, 1008. **Rf:** 0,69 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(4-*tert*-butylfenoxy)pyridin (32)

Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molární hmotnost: 296,19 g.mol<sup>-1</sup>



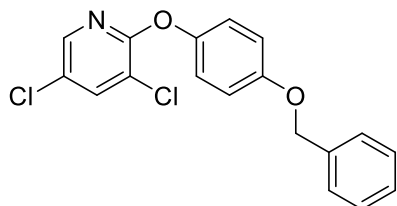
**4-*tert*-Butylfenol** (457,6 mg; 3,046 mmol), **2,3,5-trichlorpyridin** (555,7 mg; 3,046 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (2,105 g; 15,230 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:**

144 hodin. **Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 857,6 mg (95 %). Bílá krystalická látka **T.t.** 62,1-62,3 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.46 – 7.42 (m, AA', BB', 2H), 7.10 – 7.06 (m, AA', BB', 2H), 1.36 (s, 9H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.7, 150.9, 148.0, 143.5, 138.7, 126.5, 125.3, 120.5, 119.5, 34.5, 31.4. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 296,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 298,0 (80). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3041, 2959, 2868, 1573, 1508, 1430, 1386, 1288, 1254, 1205, 1171, 1065. **Rf:** 0,77 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 2-(4-Benzlyoxy)fenoxy-3,5-dichlorpyridin (33)

Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Molární hmotnost: 346,21 g.mol<sup>-1</sup>



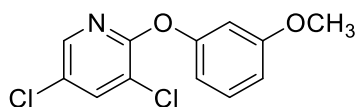
**4-(Benzyloxy)fenol** (457,9 mg; 2,287 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (417,2 mg; 2,287 mmol),  
**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (1,580 g; 11,435 mmol), **DMF** (5 ml),  
**Čas:** 120 hodin. **Sloupcová chromatografie:**  
hexan. **Výtěžek:** 594,4 mg (75 %). Bílá krystalická

látka. **T.t.** 94,6-95 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.96 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.46 – 7.31 (m, 5H), 7.09 – 7.05 (m, 2H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 5.06 (s, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158.1, 156.4, 146.9, 143.6, 138.8, 137.0, 128.7, 128.1, 127.6, 125.3, 122.5, 119.3, 115.8, 70.5. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 346,2 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 348,1 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3073, 1568, 1482, 1460, 1429, 1383, 1235, 1203, 1165, 1064, 1061. **Rf:** 0,54 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(3-methoxyfenoxy)pyridin (34)

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

Molární hmotnost: 270,11 g.mol<sup>-1</sup>



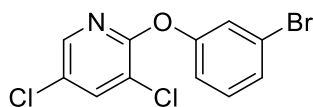
**3-Methoxyfenol** (442,0 μl; 4,028 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (734,7 mg; 4,028 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(2,783 g; 20,14 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 72 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek** 1,0 g (92 %). Bílá amorfní látka. **T.t.** 49,2-49,5 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.34 – 7.31 (m, 1H), 6.83 – 6.79 (m, 1H), 6.75 – 6.70 (m, 2H), 3.82 (s, 3H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.7, 157.5, 154.3, 143.6, 138.8, 130.0, 125.6, 119.6, 113.3, 111.1, 107.3, 55.4. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 270,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 271,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3059, 2966, 1607, 1595, 1491, 1424, 1384, 1292, 1281, 1264, 1164, 1145, 1074, 1068, 1035. **Rf:** 0,46 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 3,5-Dichlor-2-(3-bromfenoxy)pyridin (35)

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>BrCl<sub>2</sub>NO

Molární hmotnost: 318,98 g.mol<sup>-1</sup>



**3-Bromfenol** (523,6 mg; 3,025 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (367,9 mg; 3,025 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(2,091 g; 15,13 mmol), **DMF** (7 ml), **Čas:** 96 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 694,8 mg (72 %). Bílá amorfnní látka.

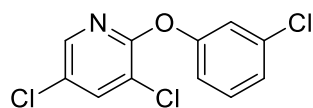
**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.34 (m, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 1H), 7.30 – 7.22 (m, 1H), 7.13 – 7.04 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.2, 154.0, 143.7, 139.1, 130.7, 128.6, 126.3, 124.8, 122.7, 120.2, 119.8. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 319,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 318,0 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 2924, 2853, 1568, 1490, 1471, 1427, 1383, 1280, 1245, 1193, 1090, 1062.

### 3,5-Dichlor-2-(3-chlorfenoxy)pyridin (36)<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>NO

Molární hmotnost: 274,53 g.mol<sup>-1</sup>



**3-Chlorfenol** (624,7 mg; 4,859 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (886,5 mg; 4,859 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(3,358 g; 24,30 mmol), **DMF** (7 ml), **Čas:** 48 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,237 g (93 %). Nažloutlá olejovitá

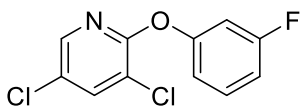
kapalina. **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 7.23 – 7.20 (m, 1H), 7.18 – 7.16 (m, 1H), 7.06 – 7.03 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.2, 154.0, 143.7, 139.1, 135.0, 130.4, 126.3, 125.7, 122.0, 119.8, 119.7. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 273,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 275,8 (95). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3064, 2930, 1568, 1473, 1461, 1427, 1383, 1269, 1249, 1236, 1195, 1090, 1063. **Rf:** 0,73 (hexan/ethyl-acetát 9:1.)

### **3,5-Dichlor-2-(3-fluorfenoxy)pyridin (37)**

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>FNO

Molární hmotnost: 258,07 g.mol<sup>-1</sup>



**3-Fluorfenol** (501,0 mg; 4,469 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (815,3 mg; 4,469 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(3,088 g; 22,35 mmol), **DMF** (7ml), **Čas:** 96 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 1,095 mg (95 %). Bezbarvý olej.

**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), 6.97 – 6.92 (m, 2H), 6.91 – 6.87 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163.2 (d, *J* = 247.6 Hz), 157.2, 154.4 (d, *J* = 11.3 Hz), 143.7, 139.1, 130.4 (d, *J* = 9.5 Hz), 126.3, 119.9, 117.0 (d, *J* = 3.4 Hz), 112.4 (d, *J* = 21.0 Hz), 109.4 (d, *J* = 24.5 Hz).

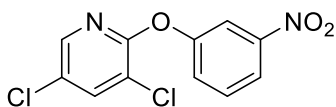
**LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 257,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 259,9 (80). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 1737, 1607, 1568, 1486, 1425, 1383, 1282, 1261, 1242, 1156, 1120, 1062.

**Rf:** 0,61 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### **3,5-Dichlor-2-(3-nitrofenoxy)pyridin (38)**<sup>47</sup>

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Molární hmotnost: 285,08 g.mol<sup>-1</sup>



**3-Nitrofenol** (512,8 mg; 3,680 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (672,4 mg; 3,680 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**  
(2,543 g; 18,40 mmol), **DMF** (7 ml), **Čas:** 72 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** hexan. **Výtěžek:** 934,4 mg (89 %). Bílá amorfnní látka.

**T.t.** 97,2-97,5. **<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.13 – 8.09 (m, 1H), 8.05 – 8.02 (m, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.61 – 7.55 (m, 1H), 7.52 – 7.48 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 156.7, 153.8, 149.1, 143.6, 139.4, 130.3, 127.8, 126.9, 120.3, 119.9, 117.0.

**LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 284,9 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 286,9 (80). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3083, 1524, 1475, 1461, 1433, 1385, 1350, 1275, 1255, 1239, 1203, 1080. **Rf:** 0,38 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

### 6.3.2 Syntéza 2-(3-bromnaftalen-2-yloxy)-3,5-dichlorpyridinu

Pro přípravu 2-(3-bromnaftalen-2-yloxy)-3,5-dichlorpyridinu (**40**) (Schéma 25) byl použit jeden ekvivalent 3-brom-2-hydroxynaftalenu (**39**), který byl navážen do baňky a ihned byl rozpuštěn v DMF (5 ml). Následně bylo přidáno pět ekvivalentů uhličitanu draselného a jeden ekvivalent 2,3,5-trichlorpyridinu (**21**). Reakční směs byla míchána 48 hodin při teplotě 90 °C. Poté byla provedena extrakce se směsí ethyl-acetátu (20 ml) a nasyceného roztoku síranu měďnatého (20 ml). Organická fáze byla poté vytřepána s vodou (20 ml) a po oddělení vysušena bezvodým síranem sodným. Následovala filtrace a odpaření rozpouštědla. Připravovaná látka byla purifikována sloupcovou chromatografií. Mobilní fází byl čistý hexan. Výtěžek připravované látky činil 75 %.

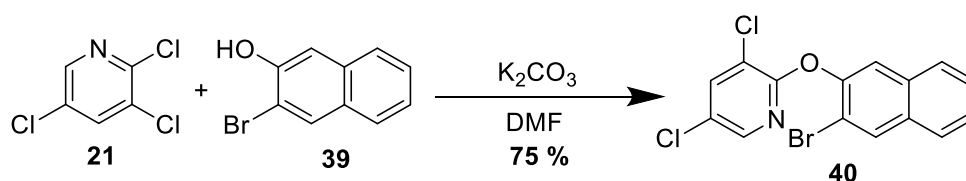
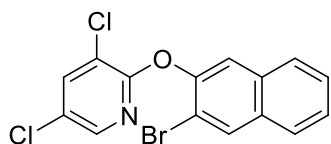


Schéma 25. Příprava produktu obsahující naftylový zbytek.

#### 2-(3-Bromnaftalen-2-yloxy)-3,5-dichlorpyridin (40)

Sumární vzorec:  $C_{15}H_8BrCl_2NO$

Molární hmotnost:  $369,04 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



**3-Bromnaftalen-2-ol** (299,0 mg; 1,347 mmol),

**2,3,5-trichlorpyridin** (245,7 mg; 1,347 mmol),  $K_2CO_3$

(930,8 mg; 6,74 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 48 hodin.

**Výtěžek:** 342,2 mg (75 %). Bílá krystalická látka.

**T.t.** 109,4-109,6.  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.15 (s, 1H), 7.91 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.79 – 7.76 (m, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 2H).

$^{13}C$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  157.4, 147.8, 143.5, 139.1, 133.1, 132.8, 132.4, 127.6, 127.0, 126.7, 126.0, 121.1, 119.3, 115.6. **LRMS** (APCI):  $m/z$  (relativní intenzita):

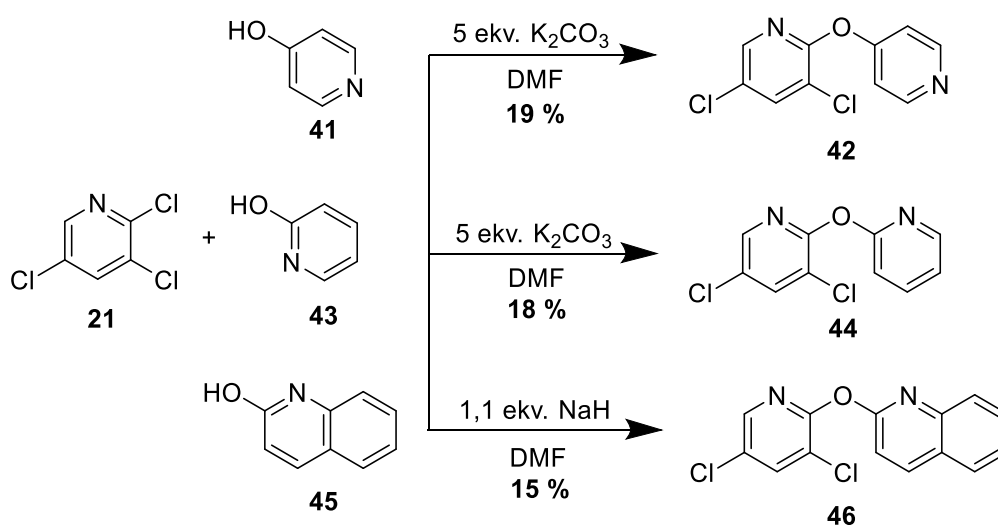
370,0 (100)  $[M+H]^+$ ; 368,0 (90). **IR:** (ATR)  $\nu_{max}[cm^{-1}]$  3059, 2926, 1570, 1438, 1427, 1384, 1302, 1288, 1251, 1229, 1165, 1066, 1001. **Rf:** 0,59 (hexan/ethyl-acetát

9:1).



### 6.3.3 Syntézy 3,5-dichlorpyridinů s heteroaromátem v poloze 2

Přípravy těchto sloučenin (**Schéma 26**) opět spočívaly v reakci jednoho ekvivalentu příslušného heteroaromátu (**41**, **43**, **45**), který byl rozpuštěn v DMF (5 ml) a následně byla přidána báze. Po několika minutách byl vsypán také jeden ekvivalent 2,3,5-trichlorpyridinu (**21**). Reakční směs byla míchána při teplotě 90 °C. Směs byla posléze vytřepána mezi roztok nasyceného síranu měďnatého (20 ml) a ethyl-acetát (20 ml). Organická fáze byla poté vytřepána s vodou (20 ml) a po oddělení vysušena síranem sodným. Následovala filtrace a odpaření rozpouštědla. Látky byly přečištěny sloupcovou chromatografií. Výťažky se pohybovaly v rozmezí od 15 % do 19 %.

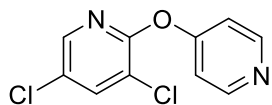


*Schéma 26. Syntézy sloučenin s dvěma heterocyklickými skelety.*

### **3,5-Dichlor-2-(pyridin-4-yloxy)pyridin (42)**

Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Molární hmotnost: 241,07 g.mol<sup>-1</sup>

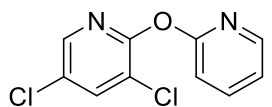


**Pyridin-4-ol** (473,4 mg; 4,978 mmol), **2,3,5-trichlorpyridin** (908,1 mg; 4,978 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (3,439 g; 24,89 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 168 hodin. **Sloupcová chromatografie:** hexanem, zpolárněno na hexan/ethyl-acetát 1:1. **Výtěžek:** 230,3 mg; (19 %). Bílá krystalická látka. **T.t.** 163,4-163,7 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.43 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.75 – 7.61 (m, AA', BB', 2H), 6.57 – 6.34 (m, AA', BB', 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.3, 148.2, 146.4, 139.9, 138.5, 132.4, 125.2, 118.3. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 241,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 242,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3053, 3009, 2983, 2922, 2850, 1628, 1569, 1554, 1435, 1342, 1300, 1197, 1186, 1088. **Rf:** 0,15 (hexan/ethyl-acetát 1:1).

### **3,5-Dichlor-2-(pyridin-2-yloxy)pyridin (44)**

Sumární vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Molární hmotnost: 241.07 g.mol<sup>-1</sup>

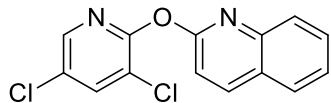


**Pyridin-2-ol** (486,1 mg; 5,112 mmol), **2,3,5-trichlorpyridin** (932,5 mg; 5,112 mmol), **K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** (3,533 g; 25,56 mmol), **DMF** (5 ml), **Čas:** 120 hodin. **Sloupcová chromatografie:** hexan, poté hexan/ethyl-acetát 9:1. **Výtěžek:** 222,0 mg (18 %). Bílá krystalická látka. **T.t.** 81,5-81,8 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.28 – 8.23 (m, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.82 – 7.76 (m, 1H), 7.16 – 7.08 (m, 2H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.4, 156.1, 147.9, 144.4, 139.8, 139.1, 127.8, 122.5, 120.3, 113.4. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 241,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 242,9 (90). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 1612, 1593, 1468, 1438, 1414, 1376, 1240, 1231, 1136, 1119, 1062. **Rf:** 0,21 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

## 2-[(3,5-Dichlorpyridin-2-yl)oxy]chinolin (46)

Sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

Molární hmotnost: 291,13 g.mol<sup>-1</sup>



**Chinolin-2-ol** (450,2 mg; 3,101 mmol),  
**2,3,5-trichlorpyridin** (565,7 mg; 3,101 mmol), **NaH**  
(136,3 mg; 3,41 mmol), **DMF** (7 ml), **Čas:** 144 hodin.

**Sloupcová chromatografie:** čistý hexan. **Výtěžek:** 134,3 mg (15 %). Světle žlutá krystalická látka. **T.t.** 93,5-93,8 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.26 – 8.21 (m, 1H), 8.19 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.84 – 7.79 (m, 2H), 7.69 – 7.62 (m, 1H), 7.52 – 7.46 (m, 1H), 7.29 – 7.20 (m, 1H). **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.5, 156.0, 146.3, 144.4, 140.2, 139.1, 130.0, 128.2, 128.1, 127.4, 126.3, 125.6, 122.9, 113.4. **LRMS** (APCI): *m/z* (relativní intenzita): 291,0 (100) [M+H]<sup>+</sup>; 292,9 (80). **IR:** (ATR) *v*<sub>max</sub>[cm<sup>-1</sup>] 3076, 1619, 1603, 1511, 1435, 1417, 1376, 1311, 1251, 1227, 1120, 1110, 1063. **Rf:** 0,58 (hexan/ethyl-acetát 9:1).

## 7. LITERATURA

1. DeKeyser, J. G.; Omiecinski, C. J., 2.10 - Constitutive Androstane Receptor. In *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, McQueen, C. A., Ed. Elsevier: Oxford, 2010; pp 169-181.
2. Ueda, A.; Hamadeh, H. K.; Webb, H. K.; Yamamoto, Y.; Sueyoshi, T.; Afshari, C. A.; Lehmann, J. M.; Negishi, M., Diverse Roles of the Nuclear Orphan Receptor CAR in Regulating Hepatic Genes in Response to Phenobarbital. *Molecular Pharmacology* **2002**, *61* (1), 1.
3. Oliviero, F.; Lukowicz, C.; Boussadia, B.; Forner-Piquer, I.; Pascussi, J.-M.; Marchi, N.; Mselli-Lakhal, L., Constitutive Androstane Receptor: A Peripheral and a Neurovascular Stress or Environmental Sensor. *Cells* **2020**, *9* (11).
4. Kachaylo, E. M.; Pustyl'nyak, V. O.; Lyakhovich, V. V.; Gulyaeva, L. F., Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. *Biochemistry. Biokhimiia* **2011**, *76* (10), 1087-97.
5. di Masi, A.; De Marinis, E.; Ascenzi, P.; Marino, M., Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med* **2009**, *30* (5), 297-343.
6. Cherian, M. T.; Chai, S. C.; Chen, T., Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2015**, *11* (7), 1099-114.
7. Chai, S. C.; Lin, W.; Li, Y.; Chen, T., Drug discovery technologies to identify and characterize modulators of the pregnane X receptor and the constitutive androstane receptor. *Drug discovery today* **2019**, *24* (3), 906-915.
8. Chen, Y.; Tang, Y.; Guo, C.; Wang, J.; Boral, D.; Nie, D., Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochemical pharmacology* **2012**, *83* (8), 1112-26.
9. Hernandez, J. P.; Mota, L. C.; Baldwin, W. S., Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation. *Current pharmacogenomics and personalized medicine* **2009**, *7* (2), 81-105.
10. Timsit, Y. E.; Negishi, M., CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **2007**, *72* (3), 231-46.
11. Pávek, P.; Červený, L.; Mičuda, S.; Štaud, F.; Čečková-Novotná, M.; Fendrich, Z., Nukleární receptory: xenosenzory zprostředkující odpověď organismu na xenobiotika a příčina některých lékových interakcí. *Remedia* **2005**, 4-5.
12. Tirona, R. G.; Kim, R. B., Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *Journal of pharmaceutical sciences* **2005**, *94* (6), 1169-86.
13. Aranda, A.; Pascual, A., Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* **2001**, *81* (3), 1269-304.
14. Wang, H.; Lecluyse, E., Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Drug-Metabolising Enzymes. *Clinical pharmacokinetics* **2003**, *42*, 1331-57.
15. Moore, L. B.; Parks, D. J.; Jones, S. A.; Bledsoe, R. K.; Consler, T. G.; Stimmel, J. B.; Goodwin, B.; Liddle, C.; Blanchard, S. G.; Willson, T. M.; Collins, J. L.; Kliewer, S. A., Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (20), 15122-7.
16. Swales, K.; Negishi, M., CAR, driving into the future. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **2004**, *18* (7), 1589-98.
17. Baes, M.; Gulick, T.; Choi, H. S.; Martinoli, M. G.; Simha, D.; Moore, D. D., A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Molecular and cellular biology* **1994**, *14* (3), 1544-52.
18. Auerbach, S. S.; Ramsden, R.; Stoner, M. A.; Verlinde, C.; Hassett, C.; Omiecinski, C. J., Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor. *Nucleic acids research* **2003**, *31* (12), 3194-207.
19. Maglich, J. M.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Goodwin, B.; Billin, A. N.; Stoltz, C. A.; Kliewer, S. A.; Lambert, M. H.; Willson, T. M.; Moore, J. T., Identification of a

- novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *The Journal of biological chemistry* **2003**, 278 (19), 17277-83.
20. Yao, R.; Yasuoka, A.; Kamei, A.; Kitagawa, Y.; Tateishi, N.; Tsuruoka, N.; Kiso, Y.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; Misaka, T.; Abe, K., Dietary flavonoids activate the constitutive androstane receptor (CAR). *J Agric Food Chem* **2010**, 58 (4), 2168-2173.
  21. Smutny, T.; Nova, A.; Drechslerová, M.; Carazo, A.; Hyrsova, L.; Hrušková, Z. R.; Kuneš, J.; Pour, M.; Špulák, M.; Pavek, P., 2-(3-Methoxyphenyl)quinazoline Derivatives: A New Class of Direct Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonists. *Journal of medicinal chemistry* **2016**, 59 (10), 4601-10.
  22. Küblbeck, J.; Niskanen, J.; Honkakoski, P., Metabolism-Disrupting Chemicals and the Constitutive Androstane Receptor CAR. *Cells* **2020**, 9 (10).
  23. Lynch, C.; Pan, Y.; Li, L.; Heyward, S.; Moeller, T.; Swaan, P. W.; Wang, H., Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* **2014**, 279 (1), 33-42.
  24. Dong, B.; Saha, P. K.; Huang, W.; Chen, W.; Abu-Elheiga, L. A.; Wakil, S. J.; Stevens, R. D.; Ilkayeva, O.; Newgard, C. B.; Chan, L.; Moore, D. D., Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, 106 (44), 18831-6.
  25. Jiang, M.; Xie, W., Role of the constitutive androstane receptor in obesity and type 2 diabetes: a case study of the endobiotic function of a xenobiotic receptor. *Drug Metabolism Reviews* **2013**, 45 (1), 156-163.
  26. Yamamoto, Y.; Moore, R.; Hess, H. A.; Guo, G. L.; Gonzalez, F. J.; Korach, K. S.; Maronpot, R. R.; Negishi, M., Estrogen Receptor  $\alpha$  Mediates 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol Causing Hepatotoxicity\*. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281 (24), 16625-16631.
  27. Qatanani, M.; Moore, D. D., CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. *Current drug metabolism* **2005**, 6 (4), 329-39.
  28. Huang, W.; Zhang, J.; Chua, S. S.; Qatanani, M.; Han, Y.; Granata, R.; Moore, D. D., Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100 (7), 4156-61.
  29. Huang, W.; Zhang, J.; Moore, D. D., A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR. *The Journal of clinical investigation* **2004**, 113 (1), 137-43.
  30. Beilke, L. D.; Aleksunes, L. M.; Holland, R. D.; Besselsen, D. G.; Beger, R. D.; Klaassen, C. D.; Cherrington, N. J., Constitutive Androstane Receptor-Mediated Changes in Bile Acid Composition Contributes to Hepatoprotection from Lithocholic Acid-Induced Liver Injury in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* **2009**, 37 (5), 1035-1045.
  31. Sberna, A. L.; Assem, M.; Gautier, T.; Grober, J.; Guiu, B.; Jeannin, A.; Pais de Barros, J. P.; Athias, A.; Lagrost, L.; Masson, D., Constitutive androstane receptor activation stimulates faecal bile acid excretion and reverse cholesterol transport in mice. *Journal of hepatology* **2011**, 55 (1), 154-61.
  32. Wang, X.; Sykes, D. B.; Miller, D. S., Constitutive Androstane Receptor-Mediated Up-Regulation of ATP-Driven Xenobiotic Efflux Transporters at the Blood-Brain Barrier. *Molecular Pharmacology* **2010**, 78 (3), 376-383.
  33. Chakraborty, S.; Kanakasabai, S.; Bright, J. J., Constitutive androstane receptor agonist CITCO inhibits growth and expansion of brain tumour stem cells. *British journal of cancer* **2011**, 104 (3), 448-59.
  34. Hudson, G. M.; Flannigan, K. L.; Erickson, S. L.; Vicentini, F. A.; Zamponi, A.; Hirota, C. L.; Alston, L.; Altier, C.; Ghosh, S.; Rioux, K. P.; Mani, S.; Chang, T. K.; Hirota, S. A., Constitutive androstane receptor regulates the intestinal mucosal response to injury. *British journal of pharmacology* **2017**, 174 (12), 1857-1871.
  35. Huang, W.; Zhang, J.; Washington, M.; Liu, J.; Parant, J. M.; Lozano, G.; Moore, D. D., Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor

- constitutive androstane receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **2005**, *19* (6), 1646-53.
36. Yamamoto, Y.; Moore, R.; Goldsworthy, T. L.; Negishi, M.; Maronpot, R. R., The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer research* **2004**, *64* (20), 7197-200.
37. Bae, S. D. W.; Nguyen, R.; Qiao, L.; George, J., Role of the constitutive androstane receptor (CAR) in human liver cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2021**, *1875* (2), 188516.
38. McMurry, J., *Organická chemie*. Vyd. 1. ed.; VUTIUM; Vysoká škola chemicko-technologická: V Brně : V Praze, 2007; p 551-554.
39. Clayden, J. G. N. W. S. G., *Organic chemistry*. Oxford University Press: Oxford; New York, 2012.
40. March, J., *Advanced organic chemistry : reactions, mechanism and structure*. John Wiley & Sons: New York, 1995.
41. McMurry, J., *Organická chemie*. Vyd. 1. ed.; VUTIUM; Vysoká škola chemicko-technologická: V Brně: V Praze, 2007; p 510-511.
42. McMurry, J., *Organická chemie* Vyd. 1. ed.; VUTIUM ; Vysoká škola chemicko-technologická: V Brně: V Praze, 2007; p 1064-1066.
43. Schlosser, M.; Ruzziconi, R., Nucleophilic Substitutions of Nitroarenes and Pyridines: New Insight and New. *Synthesis* **2010**, 2111–2123.
44. Zhou, Q.; Zhang, B.; Du, T.; Gu, H.; Ye, Y.; Jiang, H.; Chen, R., ChemInform Abstract: Copper-Catalyzed Highly Regioselective 2-Aryloxylation of 2,x-Dihalopyridines. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 327–333.
45. Monnier, F.; Taillefer, M., Catalytic C-C, C-N, and C-O Ullmann-type coupling reactions. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2009**, *48* (38), 6954-71.
46. Sperotto, E.; van Klink, G. P. M.; van Koten, G.; de Vries, J. G., The mechanism of the modified Ullmann reaction. *Dalton Transactions* **2010**, *39* (43), 10338-10351.
47. Fujikawa, K.-i.; Kondo, K.; Yokomichi, I.; Kimura, F.; Haga, T.; Nishiyama, R., Studies on Herbicidal Activities of Phenoxy pyridines. *Agricultural and Biological Chemistry* **1970**, *34* (1), 68-79.
48. Guo, S.; Zhong, X.; Gong, B.; Cui, H.; Xiang, J., Synthesis of Pyrido[2,3-b][1,4]benzoxazepines via a Friedel Crafts Cyclization. *ChemInform* **2016**, *47*.
49. Auerbach, S. S.; Stoner, M. A.; Su, S.; Omiecinski, C. J., Retinoid X receptor-alpha-dependent transactivation by a naturally occurring structural variant of human constitutive androstane receptor (NR1I3). *Mol Pharmacol* **2005**, *68* (5), 1239-53.
50. Microbiology, E. C. f. A. S. T. o. t. E. S. o. C.; Diseases, I., Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* **2003**, *9* (8), ix-xv.
51. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2008**, *14* (4), 398-405.
52. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2008**, *14* (10), 982-4.
53. Franzblau, S. G.; Witzig, R. S.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M. T.; Cook, M. B.; Quenzer, V. K.; Ferguson, R. M.; Gilman, R. H., Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of clinical microbiology* **1998**, *36* (2), 362-6.
54. Schön, T.; Werngren, J.; Machado, D.; Borroni, E.; Wijkander, M.; Lina, G.; Mouton, J.; Matuschek, E.; Kahlmeter, G.; Giske, C.; Santin, M.; Cirillo, D. M.; Viveiros, M.; Cambau, E., Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates - the EUCAST broth microdilution reference method for MIC determination. *Clinical microbiology*

*and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2020**, 26 (11), 1488-1492.

55. Li, J.; Xu, Z.; Chen, R.; Li, L.; Zhang, T.; Wang, S.; Niu, J. Aryloxy anilino propionic ester compound and application thereof as herbicide. 3.12.2015, 2016.

## 8. PŘÍLOHOVÁ ČÁST

### 8.1 Seznam použitých zkratk

AC	<i>Absidia corymbifera</i>
ACI	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AF-1	activation function 1 domain
AF-2	activation function 2 domain
AFla	<i>Aspergillus flavus</i>
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
Ar	aryl
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
ATR	Attenuated Total Reflectance
brs	broad singlet
CA1	<i>Candida albicans</i>
CAR	constitutive androstane receptor
CCM	České sbírky mikroorganismů
CCRP	cytoplasmic CAR-retaining Protein
cDNA	cyklická DNA
CITCO	6-(4-chlorfenyl)imidazo[2,1- <i>b</i> ][1,3]thiazol-5-karbaldehyd- <i>O</i> -(3,4-dichlorbenzyl)oxim
CK	<i>Candida krusei</i>
CP	<i>Candida parapsilosis</i>
CPX	ciprofloxacin
CT	<i>Candida tropicalis</i>
CYP	cytochrom P
d	dublet
DBD	DNA-binding domain
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSM	Německá sbírka mikroorganismů
E2	eliminační reakce (bimolekulární)
EC	<i>Escherichia coli</i>



EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
ekv.	ekvivalent
Et	ethyl
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G6Pase	glucose 6-phosphatase
GST	glutathion-S-transferáza
hCAR	human constitutive androstane receptor
HEPG2	human hepatocellular carcinoma cells
HetAr	heteroaryl
HSP90	heat shock protein 90
IC <sub>50</sub>	koncentrace látky, při které dochází k inhibici růstu 50 % organismů
INH	isoniazid
IR	infračervená spektroskopie
KP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LBD	ligand-binding domain
LRMS	hmotnostní spektroskopie s nízkým rozlišením
m	multiplet
M.	<i>Mycobacterium</i>
mCAR	mouse constitutive androstane receptor
MDR1	multidrug resistance praprotein
Me	methyl
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MRP2	multidrug resistance-associated proteins
MRPs	multidrug resistance-associated proteins
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
NaOEt	ethoxid sodný
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
n-BuLi	n-butyllithium
n/d	nedetekováno
NES1	nuclear export signal 1
NES2	nuclear export signal 2
NMR	nukleární magnetická rezonance

NLS	nuclear localisation signal
OATP	organic anion transporting polypeptide
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBREM	phenobarbital-responsive enhancer modul
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PP2-A	Protein Phosphatase 2A
PPP1R16A	Membrane-associated subunit of Protein Phosphatase 1 $\beta$
RAREs	retinoic acid response element
RE	responzivní element
Rf	retenční faktor
PXR	pregnane X receptor
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RXR	9- <i>cis</i> -retinoic acid receptor
s	singlet
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Sn1	nukleofilní substituce (jednomolekulární)
Sn2	nukleofilní substituce (bimolekulární)
SULT	sulfotransferáza
T3	trijodtironin
T4	tyroxin
TBAF	tetra-n-butylamonium fluorid
TCPOBOP (TCP)	1,4-bis[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]benzen
THF	tetrahydrofuran
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMEDA	tetramethylethylendiamin
t.t.	teplota tání
UDP	uridindifosfát
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
UV	ultrafialové záření
XRS	xenobiotic responsive sequence

## 8.2 Seznam schémat

<b>Schéma 1.</b> K disociaci nedochází, a proto S <sub>N</sub> 1-reakci nelze uskutečnit. <sup>38</sup> .....	19
<b>Schéma 2.</b> S <sub>N</sub> 2-reakci nelze uskutečnit z prostorového hlediska. <sup>38</sup> .....	19
<b>Schéma 3.</b> Adičně-eliminační mechanismus nukleofilní aromatické substituce. <sup>38</sup> ...	19
<b>Schéma 4.</b> Eliminačně-adiční mechanismus nukleofilní aromatické substituce. <sup>38</sup> ...	20
<b>Schéma 5.</b> Nukleofilní aromatická substituce pyridinu. <sup>42</sup> .....	22
<b>Schéma 6.</b> Možné ovlivnění regiosektivity pyridinu. <sup>43</sup> .....	22
<b>Schéma 7.</b> Optimalizace reakčních podmínek mědí katalyzovanou reakcí. ....	23
<b>Schéma 8.</b> Ullmannův coupling. <sup>46</sup> .....	24
<b>Schéma 9.</b> Reakce 2,3,5-trichlorpyridinu <b>21</b> s 4-methylfenolem <b>22</b> . <sup>44</sup> .....	24
<b>Schéma 10.</b> Syntéza knihovny herbicidů. <sup>47</sup> .....	25
<b>Schéma 11.</b> Návrh výchozích látek a produktů.....	27
<b>Schéma 12.</b> Návrh produktů obsahující další heteroaromát.....	27
<b>Schéma 13.</b> Syntéza 3,5-dichlor-2-fenoxypyridinu substituovaných v poloze 4'. ...	29
<b>Schéma 14.</b> Syntéza derivátů fenoxypyridinů substituovaných v poloze 3' .....	30
<b>Schéma 15.</b> Příprava sloučeniny nesoucí naftylový fragment. ....	31
<b>Schéma 16.</b> Syntéza sloučeniny s dvěma pyridinovými heterocykly. ....	31
<b>Schéma 17.</b> Syntéza sloučeniny s dvěma pyridinovými heterocykly. ....	32
<b>Schéma 18.</b> Příprava produktu nesoucím chinolinový skelet. ....	32
<b>Schéma 19.</b> Pokusy o přípravu derivátu s pyrimidinovým heterocyklem. ....	33
<b>Schéma 20.</b> Izolovaný produkt s dimethylamino skupinou v poloze 2.....	33
<b>Schéma 21.</b> Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin I.....	34
<b>Schéma 22.</b> Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin II. ....	34
<b>Schéma 23.</b> Neúspěšný pokus o přípravu produktu obsahující chinazolin III.....	34
<b>Schéma 24.</b> Syntéza první série sloučenin. ....	48
<b>Schéma 25.</b> Příprava produktu obsahující naftylový zbytek.....	57
<b>Schéma 26.</b> Syntézy sloučenin s dvěma heterocyklickými skelety. ....	58

### 8.3 Seznam obrázků

<b>Obrázek 1.</b> Inverzní agonisté CAR receptoru androstanol <b>1</b> a androstenol <b>2</b> . <sup>7</sup> .....	2
<b>Obrázek 2.</b> Fenobarbital jako aktivátor CAR. <sup>4</sup> .....	3
<b>Obrázek 3.</b> Struktura CAR receptoru. <sup>14</sup> .....	5
<b>Obrázek 4.</b> Přímá a nepřímá cesta aktivace CAR receptoru. <sup>16</sup> .....	6
<b>Obrázek 5.</b> TCPOBOP jako přímý agonista mCAR. <sup>15</sup> .....	8
<b>Obrázek 6.</b> CITCO jako přímý agonista hCAR. <sup>19</sup> .....	8
<b>Obrázek 7.</b> Příklady nepřímých aktivátorů CAR receptoru. <sup>4</sup> .....	9
<b>Obrázek 8.</b> Galangin <b>8</b> , baicalein <b>9</b> , chrysin <b>10</b> . <sup>20</sup> .....	10
<b>Obrázek 9.</b> Látky odvozené od struktury chinazolinu. <sup>21</sup> .....	10
<b>Obrázek 10.</b> Rozdíly v metabolismu myššího a lidského CAR receptoru. <sup>23</sup> .....	14
<b>Obrázek 11.</b> Šestičlenný heterocyklus pyridinu. <sup>41</sup> .....	20
<b>Obrázek 12.</b> Resonanční struktura pyridinu. <sup>42</sup> .....	21
<b>Obrázek 13.</b> Reaktivita pyridinu během elektrofilní a nukleofilní substituce. <sup>42</sup> .....	21
<b>Obrázek 14.</b> Obecná struktura připravovaných látek. ....	26
<b>Obrázek 15.</b> Aktivace CAR receptoru metodou Luciferase Reporter Assay. ....	35
<b>Obrázek 16.</b> Syntetizované látky aktivující CAR receptor. ....	36
<b>Obrázek 17.</b> Účinek testovaných látek na expresi Renilla luciferázy . ....	36
<b>Obrázek 18.</b> Inhibice myššího CAR receptoru látkami <b>24</b> , <b>26</b> , a <b>38</b> . ....	37
<b>Obrázek 19.</b> Syntetizované látky inhibující CAR receptor. ....	37

## 8.4 Seznam tabulek

<b>Tabulka 1.</b> Příklady klinicky používaných léčiv ovlivňující CAR receptor. <sup>3</sup> .....	9
<b>Tabulka 2.</b> Substituovaný 3,5-dichlor-2-fenoxypyridin v poloze 4' .....	30
<b>Tabulka 3.</b> Substituovaný 3,5-dichlor-2-fenoxypyridin v poloze 3' .....	31
<b>Tabulka 4.</b> Podmínky syntézy 2-[(3,5-dichlorpyridin-2-yl)oxy]pyrimidinu .....	33
<b>Tabulka 5.</b> Bakteriální toxicita připravených sloučenin .....	38
<b>Tabulka 6.</b> Antimykotická toxicita připravených sloučenin I. ....	39
<b>Tabulka 7.</b> Antimykotická aktivita připravených sloučenin II. ....	40