

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra organické a bioorganické chemie



**Syntéza substituovaných oxadiazolov s predpokladanou  
antimykobakteriálnou aktivitou**

Diplomová práca

Mészárosová Daniela

Vedúca práce: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Hradec Králové 2019

## Prehlásenie

„Týmto prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím autorským dielom. Všetka literatúra a zdroje použité v tejto práci sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú citované. Táto práca nebola použitá k získaniu rovnakého alebo iného titulu.“

V Hradci Králové 2019

Daniela Mészárosová

## Pod'akovanie

Rada by som touto cestou vyjadrila veľké poďakovanie a obdiv Ing. Galine Karabanovich, Ph.D. za jej odborné rady, pomocnú ruku, trpezlivosť i všetok čas, ktorý mi venovala pri vypracovaní praktickej a teoretickej časti práce. Ďakujem tiež doc. PharmDr. Jaroslavovi Rohovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a pomoc.

# 1. Obsah

PREHLÁSENIE.....	2
POĎAKOVANIE .....	3
1. OBSAH .....	4
2. ABSTRAKT .....	7
3. ABSTRACT .....	10
4. ÚVOD .....	13
4.1. TUBERKULÓZA .....	13
4.2. SÚČASNÁ TERAPIA TUBERKULÓZY .....	17
4.2.1. <i>Liečba citlivej TB</i> .....	17
4.2.2. <i>Liečba liekovo-rezistentnej TB</i> .....	20
4.3. VÝVOJ NOVÝCH ANTITUBERKULOTÍK .....	22
4.3.1. <i>Nové užitie už známych liečiv</i> .....	22
4.3.2. <i>Vývoj nových antituberkulotík</i> .....	23
5. TEORETICKÁ ČÁST .....	28
5.1. 1-SUBSTITUOVANÉ 5-[(3,5-DINITROBENZYL)SULFANYL]-1H-TETRAZOLY A ICH IZOSTÉRNE ANALÓGY .....	28
5.2. 1,5- A 2,5-DISUBSTITUOVANÉ TETRAZOLY .....	31
5.3. 3,5-DINITROBENZYLSULFANYL-1,3,4-OXADIAZOLY A THIADIAZOLY .....	32
5.4. REVERZNÉ ANALÓGY 1,5-DISUBSTITUOVANÝCH TETRAZOLOV A 2,5-DISUBSTITUOVANÝCH OXADIAZOLOV .....	33
6. CIELE PRÁCE .....	36
7. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	39

<b>7.1.</b>	<b>PRÍPRAVA 3-(4-CHLORFENYL)-5-((3,5-DINITROBENZYL)SULFANYL)-1,2,4-OXADIAZOLU .....</b>	<b>39</b>
	<i>7.1.1. Príprava 4-chlor-N'-hydroxybenzamidoximu .....</i>	<i>39</i>
	<i>7.1.2. Príprava 3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu .....</i>	<i>40</i>
	<i>7.1.3. Príprava 4-chloro-N'-((ethoxykarbonyl)oxy)benzimidamidu .....</i>	<i>42</i>
	<i>7.1.4. Príprava 4H-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-onu .....</i>	<i>43</i>
	<i>7.1.5. Príprava 4H-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thionu .....</i>	<i>44</i>
	<i>7.1.6. Príprava 3-(4-chlorfenyl)-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu ...</i>	<i>45</i>
<b>7.2.</b>	<b>PRÍPRAVA 5-((3,5-DINITROBENZYL)SULFANYL)-3-FENYL-1,2,4-OXADIAZOLOV .....</b>	<b>46</b>
	<i>7.2.1. Príprava N'-hydroxybenzimidamidu .....</i>	<i>46</i>
	<i>7.2.2. Príprava 3-fenyl-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu .....</i>	<i>47</i>
	<i>7.2.3. Príprava 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-fenyl-1,2,4-oxadiazolu .....</i>	<i>49</i>
<b>7.3.</b>	<b>PRÍPRAVA 5-((3,5-DINITROBENZYL)SULFANYL)-3-(4-METHOXYFENYL)-1,2,4-OXADIAZOLOV ...</b>	<b>50</b>
	<i>7.3.1. Príprava N'-hydroxy-4-methoxybenzimidamidu (17) .....</i>	<i>50</i>
	<i>7.3.2. Príprava 3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (18) .....</i>	<i>51</i>
	<i>7.3.3. Príprava 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazolu ...</i>	<i>52</i>
<b>7.4.</b>	<b>PRÍPRAVA 5-ALKYLSULFANYL-3-(3,5-DINITROFENYL)-1,2,4-OXADIAZOLOV .....</b>	<b>54</b>
	<i>7.4.1. Príprava N'-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamidu .....</i>	<i>54</i>
	<i>7.4.2. Príprava 3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu .....</i>	<i>55</i>
	<i>7.4.3. Príprava 5-(3,4-dichlorbenzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu</i>	<i>56</i>

7.4.4. Príprava 5-(3,4-dichlorbenzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu ONE POT reakciou .....	57
7.4.5. Príprava 5-(benzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu ONE POT reakciou.....	59
<b>8. VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>61</b>
8.1. TESTOVANIE ANTIMYKOBAKTERIÁLNEJ AKTIVITY <i>IN VITRO</i> .....	63
8.2. TESTOVANIE CYTOTOXICITY <i>IN VITRO</i> .....	65
8.3. TESTOVANIE ANTIMYKOTICKEJ A ANTIBAKTERIÁLNEJ AKTIVITY <i>IN VITRO</i> .....	66
<b>9. ZÁVER .....</b>	<b>68</b>
<b>10. ZOZNAM SKRATIEK .....</b>	<b>70</b>
<b>11. ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>72</b>
<b>12. ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>73</b>
<b>13. POUŽITÁ LITERATURA, CITACE .....</b>	<b>74</b>

## 2. Abstrakt

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra organickej a bioorganickej chémie

Autor: Daniela Mészárosová  
Školiteľ: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.  
Názov diplomovej práce: Syntéza substituovaných oxadiazolov s predpokladanou antimykobakteriálnou aktivitou

Tuberkulóza je infekčné ochorenie spôsobené mykobaktériami *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), ktoré je jednou z desiatich najčastejších príčin úmrtia vo svete. Podľa svetovej zdravotníckej organizácie bolo v roku 2016 zaznamenaných 10,4 milióna nových prípadov a 1,7 milióna ľudí tomuto ochoreniu podľahlo (vrátane 0,4 milióna ľudí s HIV). Liečba tuberkulózy spôsobenej liekovo citlivými kmeňmi *M. tuberculosis* je veľmi úspešná, vylieči sa až 82% pacientov. Veľkým problémom je ale terapia pacientov s liekovo rezistentnými kmeňmi *M. tuberculosis*. Multiliekovo-rezistentná tuberkulóza (MDR-TB) je TB, ktorá sa nedá vyliečiť izoniazidom (INH) ani rifampicínom (RIF), takže dvomi najúčinnjšími antituberkulotikami prvej línie. V takomto prípade je TB liečená antituberkulotikami druhej línie, ktoré je nutné podávať až dva roky. I tak sa v Európskej únii podľa štatistiky úspešne vylieči iba 32,2% pacientov s MDR-TB. Preto je dôležité venovať sa hľadaniu a vývoji nových liečiv, ktoré by pôsobili na MDR-TB a mohli pomôcť znížiť dobu a náklady liečby.

V predchádzajúcich prácach na katedre organickej a bioorganickej chémie bolo zistené, že 2,5-disubstituované 1,3,4-oxadiazoly, ktoré vo svojej štruktúre nesú 3,5-dinitrobenzylsulfanylovú skupinu a ich reverzné analógy, ktoré nesú 3,5-dinitrofenylovú skupinu priamo pripojenú na heterocyklus, vykazujú významnú a selektívnu antimykobakteriálnu aktivitu. Spomenuté zlúčeniny vykazujú *in vitro*

antimykobakteriálnu aktivitu v rozmedzí MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) 0,03-0,06  $\mu\text{M}$ .

Z predchádzajúcich vykonaných štúdií vzťahov medzi štruktúrou a antimykobakteriálnou aktivitou spomenutých 1,3,4-oxadiazolov bolo zistené, že heterocyklus môže významne ovplyvniť účinnosť zlúčenín. 1,3,4-oxadiazoly vykazovali výrazne vyššiu účinnosť než 1,5- a 2,5-disubstituované tetrazoly a než látky neobsahujúce heterocyklus. Cieľom tejto práce bolo pripraviť sériu látok bioizostérnou zámenou 1,3,4-oxadiazolu za 1,2,4-oxadiazol a zistiť, ako usporiadanie heteroatómov v heterocykle ovplyvní antimykobakteriálnu aktivitu.

Najprv bola pripravená séria 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolov. Boli použité dve metódy prípravy 1,2,4-oxadiazolu. Prvá metóda vychádzala z reakcie odpovedajúceho nitrilu s *N,N*-diisopropylethylamínom a následným uzavretím 1,2,4-oxadiazolového kruhu pomocou 1,1'-thiokarbonyldiimidazolu. Touto metódou boli pripravené všetky cieľové oxadiazoly vo výťažku 70-87%. Následnou alkyláciou pripravených 3-aryl-1,2,4-oxadiazolov-5-thiolov boli syntetizované finálne látky s výťažkom 31-98%. Druhou metódou bola reakcia 4-chlorbenzamidoximu s ethylchloroformiátom, následná cyklizácia a na 1,2,4-oxadiazol-5-on a zámena karbonylovej skupiny na 1,2,4-oxadiazole za thiokarbonylovú reakciou s Lawessonovým činidlom. Posledná reakcia však neprebíhala a 3-chlorfenyl-1,2,4-oxadiazol-5-thiol sa touto metódou nepodarilo pripraviť.

Následne bola pripravená séria 5-alkylsulfanyl-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolov, teda reverzných analógov. Pre syntézu 3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu bol použitý rovnaký postup ako pre prípravu 3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-thiolov. Výťažok reverzného 1,2,4-oxadiazol-5-thiolu bol 44%. Alkyláciou tohto thiolu boli pripravené 2 finálne látky. Vzhľadom k nízkym výťažkom metódou postupných reakcií bola použitá metóda „one pot“, ktorá bola pre reverzné analógy výhodnejšia.



Z piatich pripravených štruktúr bola u štyroch zlúčenín testovaná ich antimykobakteriálna aktivita a u dvoch látok ich cytotoxicita a antimykotická a antibakteriálna aktivita. Látky vykazovali relatívne podobnú či vyššiu antimykobakteriálnu aktivitu než štandardne používané antituberkulotikum 1. línie izoniazid, ale výrazne nižšiu aktivitu než rovnako substituované deriváty 1,3,4-oxadiazolov.

### 3. Abstract

*Charles University  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Department of Organic and Bioorganic Chemistry*

*Author: Daniela Mészárosová  
Supervisor: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.  
Title of Diploma Thesis: Synthesis of substituted oxadiazoles with potential antimycobacterial activity*

Tuberculosis is an infectious disease caused by mycobacteria *Mycobacterium tuberculosis*, which is one of the top ten causes of death worldwide. According to the World Health Organization, 10.4 million new cases were reported in 2016 and 1.7 million people died of this disease (including 0.4 million people with HIV). Treatment of tuberculosis caused by drug-susceptible strains of *M. tuberculosis* is very successful, with up to 82% of patients cured. However, a major problem is the therapy of patients with drug resistant strains of *M. tuberculosis*. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is a TB that cannot be cured by isoniazid (INH) or rifampicin (RIF), the two most effective first-line antituberculotics. In this case, TB is treated with second-line antituberculotics, which should be administered for up to two years. However, according to statistics, only 32.2% of patients with MDR-TB are successfully cured in the European Union. Therefore, it is important to look for and develop new drugs that act on MDR-TB and can help reduce the time and cost of treatment.

In the previous work at the Department of Organic and Bioorganic Chemistry it was found that 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles bearing a 3,5-dinitrobenzylsulfanyl group and their reverse analogs carrying a 3,5-dinitrophenyl group directly attached to the heterocycle, exhibited significant and selective antimycobacterial activity. These compounds showed in vitro antimycobacterial activity in the MIC (minimal inhibitory concentration) range of 0.03-0.06  $\mu\text{M}$ .

Previous studies of the structure-antimycobacterial activity relationships of the 1,3,4-oxadiazoles have shown that the heterocycle can significantly affect the efficacy of the compounds. The 1,3,4-oxadiazoles showed significantly higher efficacy than the 1,5- and 2,5-disubstituted tetrazoles or the non-heterocyclic substances. The aim of this work was to prepare a series of substances by bioisosteric exchange of 1,3,4-oxadiazole for 1,2,4-oxadiazole and see how the arrangement of heteroatoms in the heterocycle affects antimycobacterial activity.

First, a series of 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazoles was prepared. Two methods of preparing 1,2,4-oxadiazole were used. The first method was based on the reaction of the corresponding nitrile with *N,N*-diisopropylethylamine and subsequent closure of the 1,2,4-oxadiazole ring with 1,1'-thiocarbonyldiimidazole. All target oxadiazoles in a yield of 70-87% were prepared by this method. Subsequent alkylation of the prepared 3-aryl-1,2,4-oxadiazoles-5-thiols resulted in the synthesis of the final compounds in a yield of 31-98%. The second method was the reaction of 4-chlorobenzamidoxime with ethyl chloroformate, followed by cyclization to 1,2,4-oxadiazol-5-one and replacement of the carbonyl group of the 1,2,4-oxadiazole with a thiocarbonyl group by reaction with Lawesson's reagent. However, the last reaction was not carried out and 3-chlorophenyl-1,2,4-oxadiazole-5-thiol was not prepared by this method.

Subsequently, a series of 5-alkylsulfanyl-3-(3,5-dinitrophenyl)-1,2,4-oxadiazoles, i.e. reverse analogs, was prepared. For the synthesis of 3-(3,5-dinitrophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-thiol, the same procedure was used as for the preparation of 3-aryl-1,2,4-oxadiazole-5-thiols. The yield of reverse 1,2,4-oxadiazole-5-thiol was 44%. By alkylation of this thiol, 2 final compounds were prepared. Because of the low yields of the sequential reaction method, the „one pot“ method was used, which was more advantageous for reverse analogs.

Of the five structures prepared, four compounds were tested for their antimycobacterial activity and two for their cytotoxicity and antifungal and

antibacterial activity. The substances exhibited relatively similar or higher antimycobacterial activity than the standard first-line antitubercular drug isoniazid, but significantly lower activity than equally substituted 1,3,4-oxadiazole derivatives.

## 4. Úvod

### 4.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je jednou z desiatich najčastejších príčin úmrtia vo svete. Podľa svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) bolo v roku 2016 zaznamenaných 10,4 milióna nových prípadov, z čoho 1,7 milióna ľudí tomuto onemocneniu podľahlo (vrátane 0,4 milióna ľudí s HIV). Viac než 95% úmrtí sa týka chudobnejších zemí, z čoho 7 ich pokrýva 64% tohoto celku. Za vedúcou Indiou nájdeme Indonéziu, Čínu, Filipíny, Pakistan, Nigériu a Južnú Afriku. Dobrá správa je, že TB globálne ustupuje, zatiaľ však pomaly, približne o 2% prípadov ročne. Odhaduje sa, že v období od roku 2000 do roku 2016 sa prostredníctvom diagnostiky a liečby tuberkulózy ušetrilo 53 miliónov životov. Ukončenie epidémie TB do roku 2030 patrí medzi hlavné ciele v oblasti zdravia.<sup>1,2</sup>

TB je infekčné onemocnenie spôsobené mykobaktériami *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Zvyčajne zasahuje pľúca (pulmonálna tuberkulóza), ale môže zasiahnuť aj iné miesta (extrapulmonálna tuberkulóza). Onemocnenie sa šíri vdýchnutím kvapiek obsahujúcich baktérie, ktoré ľudia trpiaci pulmonálnou tuberkulózou vylučujú do ovzdušia kašľom, kýchaním alebo pľuvaním. Odhaduje sa, že až 1,7 miliárd ľudí je celosvetovo nakazených patogénom *M. tuberculosis* a prebieha u nich tzv. latentná forma TB. Iba u relatívne malého podielu (5-15 %) infikovaných ľudí dôjde počas ich života k rozvoju aktívnej formy onemocnenia. Zvýšené riziko aktivácie a rozvoja TB je u ľudí so zníženou imunitou, ako sú HIV-positívni pacienti, ľudia trpiaci diabetom, podvýživou a ľudia používajúci tabak.<sup>1</sup>

Bohužiaľ sa ukázalo, že baktérie spôsobujúce TB si vedia vyvinúť rezistenciu proti antimikrobiálnym liekom používaným pre liečbu tohto onemocnenia. Multiliekovo-rezistentná tuberkulóza (MDR-TB) je TB, ktorá sa nedá vyliečiť izoniazidom (INH) ani rifampicínom (RIF), takže dvomi najúčinnjšími antituberkulotikami prvej línie. V takomto prípade je TB liečená antituberkulotikami

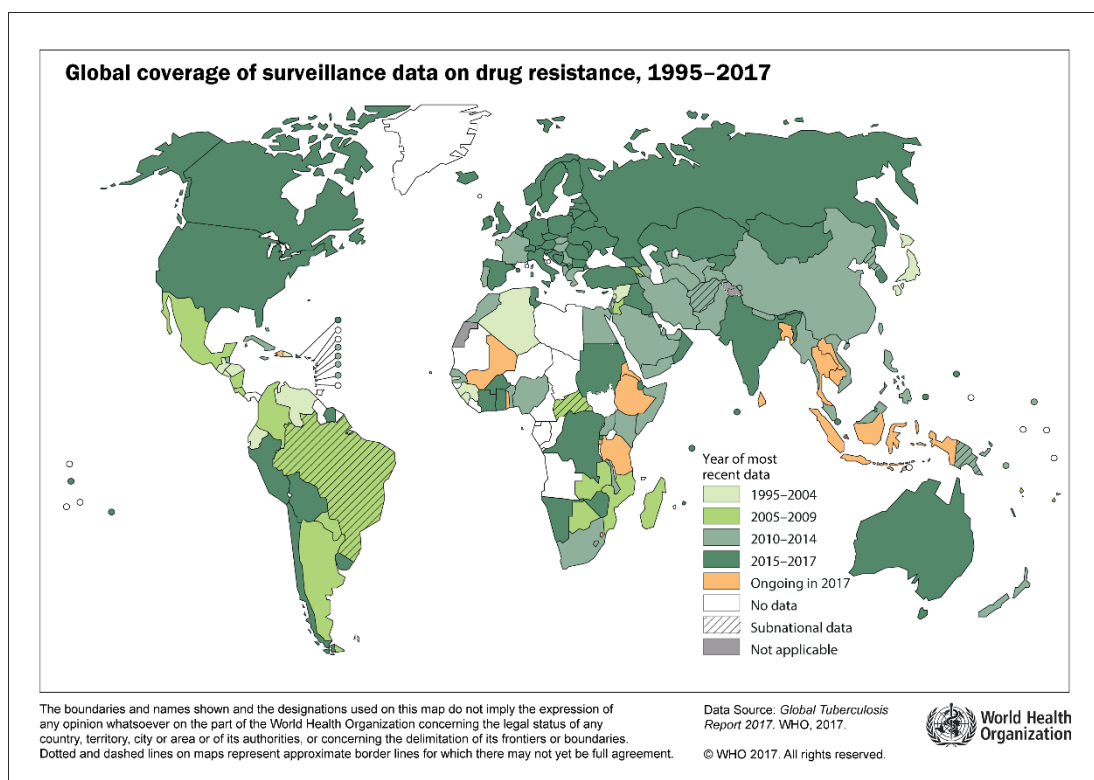
druhej línie, ktoré je nutné podávať až dva roky, zatiaľ čo TB citlivá na INH a RIF sa lieči iba 6 mesiacov. Existujú dva dôvody neustáleho vzniku MDR kmeňov:

1. Nesprávne zachádzanie s liečivými látkami - neprimerané alebo nesprávne používanie antimykobakteriálnych liekov, použitie nedostatočne účinných liekov (ako je použitie jednorazových liekov, liekov zlej kvality alebo liekov uchovávaných v zlých podmienkach) a predčasné prerušenie liečby.
2. Prenos z jednej osoby na druhú – najčastejšie v preplnených priestoroch, ako sú nemocnice či väznice.<sup>3</sup>

V niektorých zemiach sa boj s MDR-TB stáva čím ďalej obťažnejší. Možnosti liečby sú obmedzené a drahé, doporučená medikácia nie je vždy dostupná a u pacientov sa vyskytuje mnoho nežiaducich účinkov. V niektorých prípadoch sa môže objaviť ešte závažnejšia forma rezistencie.<sup>3</sup> Extenzívne rezistentná tuberkulóza (XDR-TB) je TB rezistentná ku všetkým liečivám prvej línie a navyše aspoň k jednému fluorochinolonu a jednému injekčnému antituberkulotiku druhej línie (amikacin, kapreomycin, kanamycin). WHO odhaduje, že v roku 2016 bolo 600 000 nových prípadov s rezistenciou na rifampicín – najefektívnejším liečivom prvej línie - z toho v 490 000 prípadoch šlo o MDR-TB (Obrázok 1).<sup>2</sup>

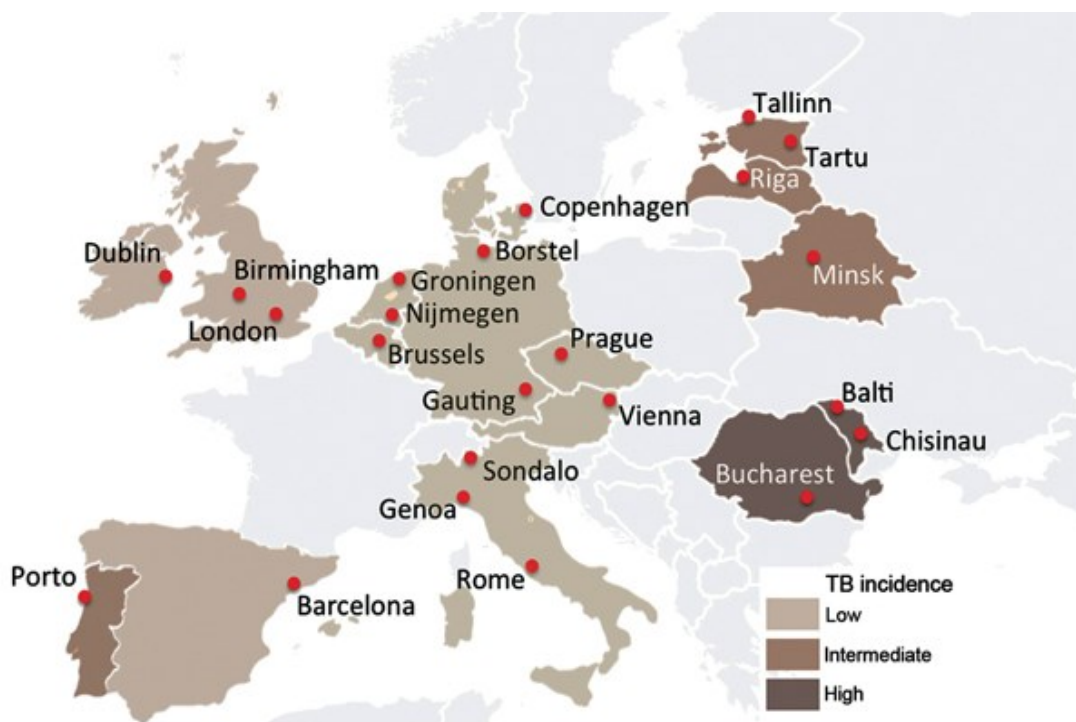
Vo verejných médiách je široko používaný ešte termín TDR-TB. Ide o TB úplne rezistentnú na všetky liečivá prvej línie ako aj liečivá druhej línie, na ktoré sa môže dať pacient testovať pomocou testov citlivosti na lieky (DST).<sup>4</sup> Rôzne krajiny sa však líšia v možnostiach testovania na rezistenciu liečiv druhej línie. Inými slovami teda možno povedať, že existujú kmene rezistentné voči všetkým liečivám, na ktoré sa môže dať pacient testovať pomocou DST. Prvý prípad TDR-TB bol zaznamenaný v roku 2003 v Taliansku, ďalšie sa vyskytli v Indii a Južnej Afrike, kde Centrum pre kontrolu a prevenciu nemocí (CDC) uviedlo, že takéto onemocnenie je „prakticky nevyliciteľné“.<sup>4</sup> WHO tento termín ale neuznáva a považuje všetky tieto prípady TB za rôzne formy XDR-TB.<sup>5</sup>

**Obrázok 1. Celosvetové údaje z dohľadu nad liekovou rezistenciou.<sup>6</sup>**



V súčasnosti sa v Európskej únii úspešne liečilo iba 32,2% pacientov s MDR-TB a 19,1% XDR-TB.<sup>6</sup> Detailné informácie o charakteristikách, manažmente a prognózach pacientov s MDR-TB a XDR-TB sú v Európe vzácne, ale nevyhnutné pre dobrú informovanosť tvorcov zdravotnej politiky.<sup>6</sup> Na základe toho bol v roku 2006 vytvorený TBNET (The Tuberculosis Network European Trials group). Ide o neziskovú mimovládnu vedeckú organizáciu, ktorá iniciuje výskum a spoluprácu v oblasti TB v Európe. Dnes táto paneurópska sieť pozostáva z viac ako 600 zdravotníckych odborníkov a vedcov, ktorých spolupráca viedla k vytvoreniu 60 recenzovaných článkov v popredných lekárskejších časopisoch.<sup>7</sup> Vďaka TBNET prebehol medzi rokmi 2010 a 2014 projekt zameraný na hodnotenie údajov získaných pozorovaním medzinárodnej skupiny pacientov s MDR/XDR-TB. Cieľom projektu bolo identifikovať modely rezistencie *M. tuberculosis* na liečivá druhej línie a rizikové faktory pre vznik pre-XDR-TB a XDR-TB. Štúdium sa uskutočnilo v 16 krajinách Európy (Obrázok 2): vo 2 s vysokým výskytom tuberkulózy (>100 prípadov/100 000 osôb), 4 s priemerným výskytom (20-100 prípadov/100 000 osôb) a 10 s nízkym výskytom (<20 prípadov/

100 000 osôb). Zistilo sa, že nízka miera úspešnosti liečby MDR-TB v Európe môže byť spôsobená nízkou frekvenciou DST proti antituberkulotikám druhej línie a zistením vysokej úrovne rezistencie na tieto liečivá, ak testovanie prebehlo. Tieto výsledky poukazujú na nalievajú potrebu zvýšenia molekulárnych a fenotypových DST proti antituberkulotikám druhej línie. To prispeje k získaniu dát potrebných k začatiu vhodných a účinných liečebných režimov pre pacientov s rezistentnou TB.<sup>8</sup>



**Obrázok 2. Lokality TBNET v celoeurópskej sieti zapojené do štúdia tuberkulózy rezistentnej na lieky.<sup>7</sup>**



## 4.2. Súčasná terapia tuberkulózy

### 4.2.1. Liečba citlivej TB

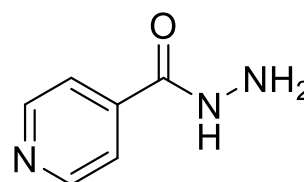
Prvá účinná liečba proti TBC bola vyvinutá v 40. rokoch 20. storočia. Súčasná doporučovaná liečba pre pacientov s aktívnou, na lieky citlivou pulmonálnou tuberkulózou je liečba štandardným šesťmesačným režimom, ktorý pozostáva z dvojmesačného užívania štvorkombinácie antituberkulotík prvej línie, tj. INH, RIF, pyrazinamidu (PZA) a ethambutolu (EMB) a následného štvormesačného užívania dvojkombinácie INH a RIF.<sup>2,9</sup>

**Tabuľka 1. V súčasnej dobe používané antituberkulotiká prvej voľby.**

<b>Antituberkulotiká 1. línie:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• INH</li><li>• RIF</li><li>• PZA</li><li>• EMB</li></ul>
------------------------------------	---

#### 1. Isoniazid

INH (Obrázok 3), hydrazid kyseliny izonikotínovej, je vysoko baktericídny proti replikácii tuberkulózneho bacilu. Je rýchlo absorbovaný a ľahko sa rozptýli do všetkých tekutín a tkanív. Jeho mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy mykolovej kyseliny



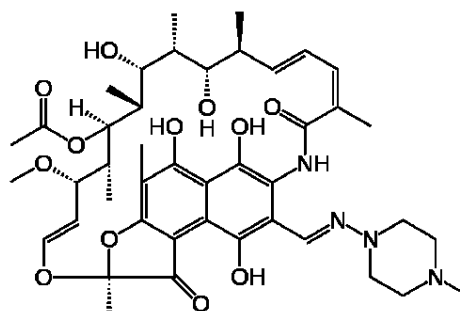
**Obrázok 3. Štruktúra Isoniazidu**

v bunkovej stene, deplécii zásob nukleových kyselín a metabolickej depresii.<sup>10</sup> Samotný INH nie je pre bakteriálne bunky toxický, ale pôsobí ako proliečivo a je aktivovaný mykobakteriálnym enzýmom KatG. Ide o multifunkčnú kataláza-peroxidázu, ktorej mutáciou dochádza k vzniku najčastejšej formy rezistencie proti INH. Mono-rezistencia voči INH je najbežnejšou rezistenciou na antituberkulotikum 1. línie. INH sa do 24 hodín kompletne vylúči z organizmu do moču, väčšinou vo forme

neaktívnych metabolitov. INH sa zvyčajne užíva perorálne, ale kriticky chorým pacientom sa môže podať intramuskulárne alebo intravenózne.<sup>11</sup>

## 2. Rifampicín

RIF (Obrázok 4) je polosyntetický derivát rifamycínu B, komplexné makrocyclické antibiotikum, ktoré špecificky inhibuje bakteriálnu RNA polymerázu, enzým zodpovedný za transkripciu DNA, vytvorením stabilného komplexu liečivo-enzým. Príslušné cicavčie enzýmy nie sú rifampicínom ovplyvnené.<sup>12</sup> Má baktericídne vlastnosti

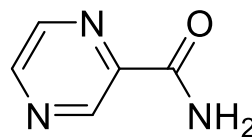


**Obrázok 4. Štruktúra Rifampicínu**

a silný sterilizačný účinok proti tuberkulóznym bacilom v celulárnej aj extracelulárnej forme. Po perorálnom podaní sa rýchlo absorbuje a distribuuje v celulárnych tkanivách a telesných tekutinách. Ak má pacient zapálené meningy, významné množstvá vstupujú do cerebrospinálnej tekutiny. RIF je veľmi silný CYP3A enzymový induktor, čo môže viesť u súčasne podávaných liečiv metabolizovaných touto izoformou cytochrómu P450 k ich subterapeutickým koncentráciám. Príkladom takýchto liečiv je aj väčšina antiretrovirov, liečiv používaných na liečbu HIV. U HIV-positívnych pacientov sa preto doporučuje na liečbu TB použiť rifabutín, semisyntetické ansamycínové antibiotikum so silným antimykobakteriálnym účinkom.<sup>13</sup> Rezistencia sa na RIF vyvíja ľahko, preto sa musí vždy podávať v kombinácii s inými účinnými antimykobakteriálnymi látkami. RIF je tiež k dispozícii na intravenózne podanie pre kriticky chorých pacientov.<sup>11</sup>

### 3. Pyrazinamid

PZA je syntetický analóg nikotínamidu, ktorý nemá takmer žiadnu aktivitu proti rastúcim tuberkulóznym bacilom, ale je primárne aktívny proti nerastúcim perzistujúcim organizmom. PZA

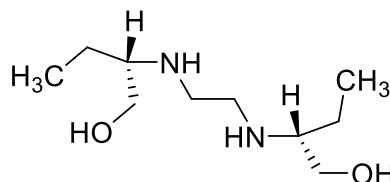


**Obrázok 5. Štruktúra Pyrazínamidu**

pôsobí odlišne od bežných antibiotík tým, že inhibuje viacero cieľov, a to tvorbu energie, transláciu a pravdepodobne i pantotenát/koenzým A, ktorý je potrebný na prežitie perzistujúcich organizmov.<sup>14</sup> Tento komplexný účinok je stále predmetom výskumu. Jeho silná sterilizačná aktivita sa prejavuje najmä v relatívne kyslom intracelulárnom prostredí (napr. pH 5,5) makrofágov a v oblastiach s akútnym zápalom. Má vysoký účinok počas prvých dvoch mesiacov liečby, kedy pretrvávajú akútne zápalové zmeny. Jeho použitie skrátilo liečebný režim a znížilo riziko recidívy. Podáva sa orálne, ľahko sa absorbuje z gastrointestinálneho traktu a rýchlo sa distribuuje do všetkých tkanív a tekutín.<sup>11</sup>

### 4. Ethambutol

EMB je syntetický kongenér 1,2-etándiamínu, účinný proti *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) a niektorým nešpecifickým mykobaktériám.<sup>11</sup> Ethambutol



**Obrázok 6. Štruktúra Ethambutolu**

inhibuje inkorporáciu D-arabínózy do arabinogalaktánu bunkovej steny mykobaktérií. Keďže je kyselina mykolová

v bunkovej stene špecificky viazaná na 5-polohu distálnych zvyškov D-arabínózy, dochádza touto inhibíciou k vyčerpaniu miest na prenos kyseliny mykolovej do bunkovej steny. Tá si na prenos teda musí nájsť alternatívne miesto. Pravdepodobne sa jedná o molekuly trehalózy, čo spôsobí nadprodukciu monomykolátu a dimykolátu trehalózy. Tento počiatočný účinok lieku pravdepodobne spúšťa kaskádu zmien

lipidového metabolizmu mykobaktérii, ktoré nakoniec vedú k bunkovej smrti. Jeho presný mechanizmus účinku však doposiaľ nie je známy.<sup>15</sup> Používa sa v kombinácii s inými anti-TB liekmi na prevenciu alebo oddialenie vzniku rezistentných kmeňov. Podáva sa perorálne a je ľahko absorbovaný z gastrointestinálneho traktu.<sup>11</sup>

#### 4.2.2. Liečba liekovo-rezistentnej TB

**Tabuľka 2. Skupiny antituberkulotík doporučené pre liečbu MDR-TB a XDR-TB.<sup>16</sup>**

<b>A – Fluorochinolony</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• LEVOFLOXACÍN</li> <li>• MOXIFLOXACÍN</li> <li>• GATIFLOXACÍN</li> </ul>
<b>B – Injekčné antituberkulotiká druhej línie</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• KANAMYCÍN</li> <li>• AMIKACÍN</li> <li>• KAPREOMYCÍN</li> </ul>
<b>C – Ďalšie základné antituberkulotiká druhej línie</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ETIONAMID/PROTHIONAMID</li> <li>• CYKLOSERÍN/TERIZIDON</li> <li>• LINEZOLID</li> <li>• KLOFAZIMÍN</li> </ul>
<b>D – Prídavné antituberkulotiká</b>	<b>D1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PYRAZÍNAMID</li> <li>• ETHAMBUTOL</li> <li>• Vysoké dávky IZONIAZIDU</li> </ul>
	<b>D2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BEDAQUILIN</li> <li>• DELAMANID</li> </ul>
	<b>D3</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• P-AMINOSALICYLOVÁ KYS.</li> <li>• IMIPENEM-CILASTATIN</li> <li>• MEROPENEM</li> <li>• AMOXICILÍN-KLAVULANÁT</li> </ul>

U pacientov s MDR-TB liečebný režim pozostáva z aspoň 5 účinných antituberkulotík. Tie zahŕňujú PZA, jedno antituberkulotikum zo skupiny A, jedno zo skupiny B a aspoň dve antituberkulotiká zo skupiny C. Ak liečebný režim nemôže byť

zostavený z takto uvedených antituberkulotík, ako náhrada môže byť použité antituberkulotikum zo skupiny D2 alebo D3. Celková dĺžka liečby by mala trvať 20 mesiacov, z toho 8 mesiacov by mala trvať intenzívna fáza. Dĺžka liečby ale môže byť modifikovaná na základe odpovede pacienta na liečbu.

V roku 2016 WHO schválila použitie krátkeho, štandardizovaného režimu pre pacientov s MDR-TB, ktorí neboli doposiaľ liečení antituberkulotikami druhej línie, a ktorí nie sú infikovaní kmeňmi rezistentnými voči injekčným antituberkulotikám druhej línie a fluorochinolonom. Tento režim trvá 9-12 mesiacov a je oveľa menej nákladný ako bežná liečba MDR-TB, ktorá môže trvať až 2 roky.<sup>6</sup> Pozostáva z intenzívnej fázy, v ktorej sa podáva gatifloxacín/moxifloxacín, kanamycín/amikacín, etionamid/protionamid, klofazimín, vysoká dávka (10 mg/kg) izoniazidu, ethambutol a pyrazinamid po dobu 4-6 mesiacov. Nasleduje pokračovacia 5-mesačná fáza, kedy sa podáva gatifloxacín/moxifloxacín, klofazimín, ethambutol a pyrazinamid.<sup>17</sup>

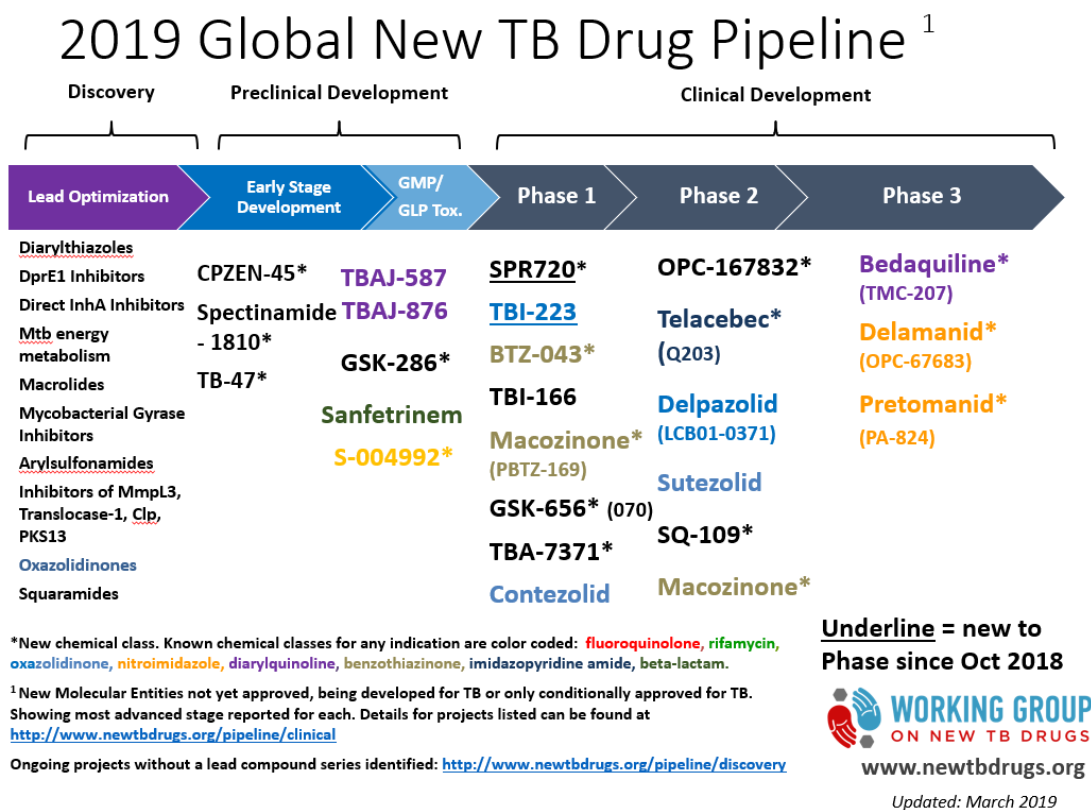
### 4.3. Vývoj nových antituberkulotík

Súčasný liečebný režim TB sú neuspokojivé z dôvodu nízkej účinnosti, vysokej toxicity, dlhého trvania a tiež značnej záťaže na zdravotné prostriedky pri liečbe multirezistentnej tuberkulózy. Problémom je tiež častý výskyt interakcií medzi jednotlivými liekmi, ako je napríklad interakcia RIF s inhibítormi proteáz a inými antiretrovirotikami. Nové antituberkulotiká ako aj liečebné režimy sú preto potrebné na zvýšenie úspešnosti vyliečenia u pacientov s rezistentnou tuberkulózou (v súčasnosti približne 50%) a na skrátenie liečby na lieky citlivej TB, ako aj na lieky rezistentnej TB.<sup>16</sup>

#### 4.3.1. Nové užitie už známych liečiv

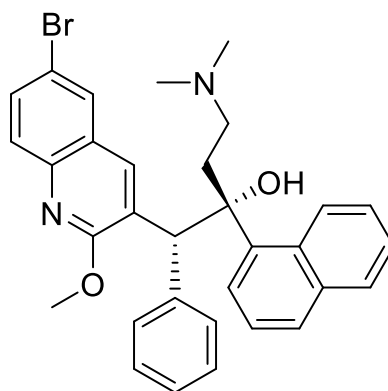
V medzičase vývoja nových liečiv sú používané ako antituberkulotiká aj už známe liečivá s pôvodne iným klinickým použitím. Najčastejšie takto použité liečivá sú Linezolid a Klofazimín. Obe liečivá hrajú významnú rolu v liečbe MDR-TB, Klofazimín má dokonca potenciál skrátenia jej liečebného režimu. Ďalšími takto použitými liečivami sú fluorchinolony, kanamycín, amikacín, karbapenemy a amoxicilín-klavulanát. Fluorchinolony tretej a štvrtej línie (levofloxacín, moxifloxacín a gatifloxacín) sú pravidelne používané na liečbu izoniazid-monorezistentnej TB a MDR-TB, kde tvoria najdôležitejšiu zložku antituberkulotík druhej línie. Predpokladalo sa, že majú potenciál redukovať dĺžku liečebného režimu TB, avšak tri nedávno uzavreté klinické štúdie tento potenciál nepotvrdili.<sup>16</sup> Sľubné výsledky z randomizovaného klinického hodnotenia fáze 2 na baktericídnu aktivitu ukázali karbapenemy. Meropenem, imipenem a ertapenem boli s úspechom použité v spojení s inými antituberkulotikami na liečbu MDR-TB a XDR-TB. Kombinácia meropenemu s klavulanátom deaktivuje mykobakteriálnu  $\beta$ -laktamázu, čo spôsobí, že sú mykobaktérie citlivé na meropeném a amoxicilín. Hoci farmakokinetické vlastnosti meropenému (intravenózna forma a tri denné podania) vylučujú jeho všeobecné použitie, jeho možnou alternáciou by mohol byť ertapeném, ktorý môže byť podaný intramuskulárne.<sup>16,17</sup>

### 4.3.2. Vývoj nových antituberkulotík



**Obrázok 7. Prehľad vyvíjaných antituberkulotík a fáz preklinického a klinického vývoja, v ktorých sa nachádzajú.<sup>18</sup>**

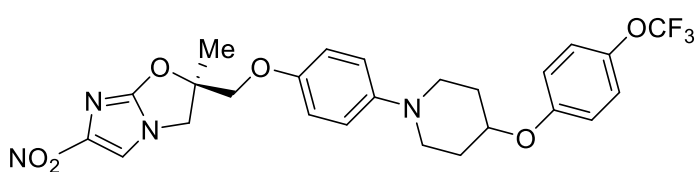
V posledných rokoch boli zaznamenané prvé regulačné schválenia nových antituberkulotík (bedaquilin a delamanid) za viac než 40 rokov. Obe liečivá boli schválené podmienene vďaka Americkej správe potravín a liečiv (FDA) a Európskej agentúre pre lieky (EMA).<sup>18</sup> Bedaquilín (Obrázok 8) patrí do novej triedy antimikrobiálnych látok známych ako diarylchinolíny. Napriek zlepšenej terapeutickej účinnosti režimov, ktoré obsahujú bedaquilín, stále pretrvávajú obavy o bezpečnosť kvôli neúplným bezpečnostným



**Obrázok 8. Štruktúra bedaquilínu**

údajom, založené iba na klinických štúdiách fázy II. Tieto otázky viedli WHO k odporúčaniu iba podmieneného použitia bedaquilínu, ktoré je obmedzené na pacientov s pľúcnym MDR-TB, pre ktorých nie sú k dispozícii vhodné alternatívy. Jeho baktericídny účinok je založený na selektívnej inhibícii mykobakteriálnej F1/F0-ATP syntázy, ktorá je kľúčovým enzýmom v procese oxidačnej fosforylácie, a teda riadenia produkcie ATP.<sup>19</sup>

Ďalšími látkami v tretej fázy klinického vývoja sú delamanid a pretomanid. Partia do štruktúrnej skupiny bicyklických nitroimidazolov a sú aktívne ako proti replikujúcim tak aj hypoxickým nereplikujúcim bacilom. Delamanid bol podmienenčne schválený Európskou agentúrou pre lieky v novembri 2013 (Obrázok 9). Je to derivát dihydro-nitroimidazooxazolu. Pôsobí tak, že inhibuje syntézu zložiek mykobakteriálnych bunkových stien, kyselinu metoxy-mykolovú a kyselinu



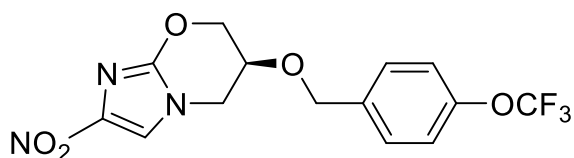
ketomykolovú. Delamanid je proliečivo, ktoré aktivuje enzým deazaflavín depedentná nitroreduktáza (Rv3547).

**Obrázok 9. Štruktúra Delamanidu**

Reaktívny medziproduktový metabolit, ktorý sa tvorí medzi delamanidovým a desnitro-imidazooxazolovým derivátom, hrá dôležitú úlohu pri inhibícii produkcie kyseliny mykolovej. Rovnako ako bedaquilin je delamanid použitý ako súčasť vhodného kombinovaného režimu u dospelých pacientov s pľúcnou MDR-TB, u ktorých sa súčasný schválený režim nemôže použiť z dôvodu rezistencie alebo intolerancie.<sup>20</sup>



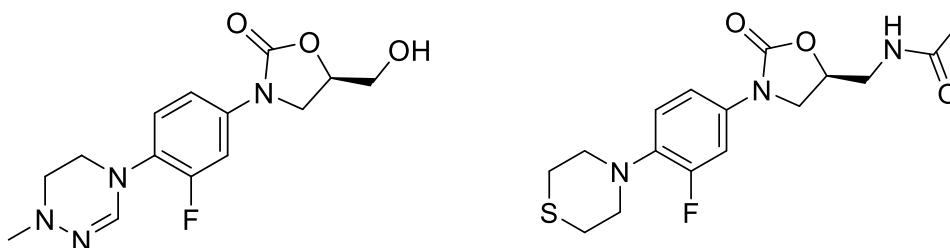
Mechanizmus účinku pretomanidu nie je úplne objasnený (Obrázok 10). Pravdepodobne pôsobí na biosyntetickú cestu kyseliny mykolovej prostredníctvom



deplécie ketomykolátov a akumulácie hydroxymykolátov.<sup>21</sup> To vysvetľuje jeho antimykobakteriálnu aktivitu v replikujúcich baktériách. Okrem

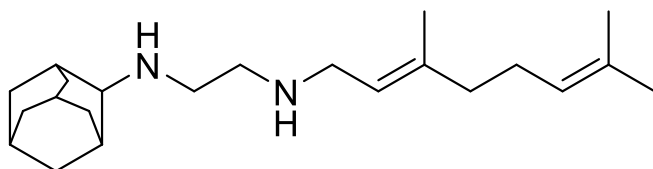
**Obrázok 10. Štruktúra pretomanidu**  
toho sa ukázalo, že derivát des-nitroimidazolu z pretomanidového metabolizmu je zodpovedný za tvorbu reaktívnych dusíkatých látok a vyčerpanie ATP, čo by vysvetľovalo jeho aktivitu za anaeróbných podmienok.<sup>22</sup>

Ďalšou skupinou vyvíjaných antituberkulotík v klinickom testovaní sú oxazolidinóny. Ich mechanizmus účinku je odlišný od ostatných antituberkulotík, a spočíva vo väzbe na 23S podjednotku rRNA, čím blokujú mikrobiálnu proteínovú syntézu. Do tejto skupiny patrí okrem už spomínaného linezolidu aj sutezolid a delpazolid, ktoré oproti linezolidu vykazujú menšie nežiaduce účinky a vyššiu aktivitu. Obe látky sú momentálne v druhej fázy klinického vývoja (Obrázok 11).<sup>23,24</sup>



**Obrázok 11. Štruktúra delpazolidu a sutezolidu**

Významnou látkou v druhej fáze klinického vývoja je SQ109, ktorý interferuje so zostavením mykolových kyselín v bunkovej stene *M. tuberculosis*. Bacily vystavené SQ109 vykazujú okamžitú inhibíciu produkcie dimykolátu trehalózy (TDM) a nedokážu naviazať mykoláty na arabinogalaktán bunkovej steny. Tieto účinky nie sú spôsobené inhibíciou syntézy mykolátov, pretože celková hladina

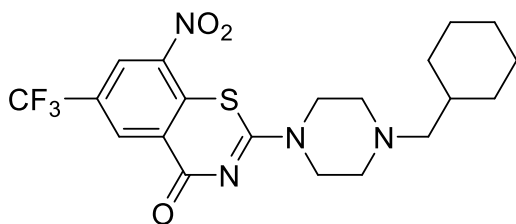


**Obrázok 12. Štruktúra antituberkulotika SQ109**

mykolátov zostala nezmenená. Došlo ale k akumulácii trehalózo-monomykolátu (TMM), prekursoru TDM a mykolátov bunkovej steny. Na základe

týchto účinkov bolo zistené, že SQ109 inhibuje membránový transportér Mmp13, zodpovedný za prenos mykolových kyselín vo forme TMM z cytoplazmy do bunkovej steny.<sup>25</sup>

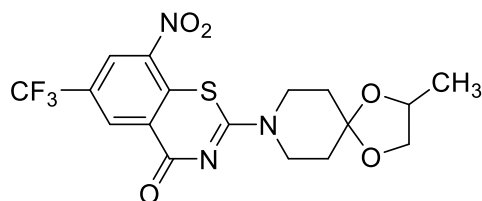
Jedným z dôležitých cieľov zásahu v súčasnosti vyvíjaných antituberkulotík je inhibícia dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-ribóza-2'-oxidázy (DprE1), čo je esenciálny enzým epimerujúci ribózu na arabinózu, ktorá je základným komponentom arabinogalaktánu mykobakteriálnej bunkovej steny. Inhibíciou tohto enzýmu



**Obrázok 13. Štruktúra macozinónu**

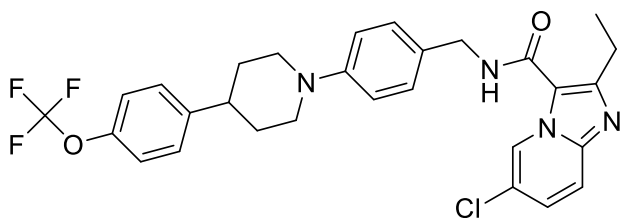
dochádza k lýze buniek a k bakteriálnej smrti. Takto účinkujú látky zo skupiny benzothiazinónov v rôznych štádiách klinického vývoja, ktoré účinkujú ako proti rastúcim, tak aj intracelulárnym bacilom. Patrí sem macozinón (PBTZ-169), OPC-167832

a BTZ-043 (Obrázok 13,14). Macozinón je derivát piperazino-benzothiazinónu, ktorý má synergický účinok pri podávaní s bedaquilínom a klofazimínom. Doposiaľ táto nádejná látka spolu s BTZ-043 a OPC-167832 vykazujú veľmi dobrú bezpečnosť aj *in vitro* a *in vivo* antimykrobiálnu aktivitu.<sup>26,27</sup>



**Obrázok 14. Štruktúra BTZ-043 (I. klinická fáza)**

Potenciálnym antituberkulotikom v druhej fáze klinického vývoja je Q203, novšie známy ako telacebec, ktorý patrí do skupiny imidazopyridín amidov. Jeho cieľ je inhibovať cytochróm bcc komplex,<sup>28</sup> variantu cytochrómu bc<sub>1</sub> komplexu, ktorý sa

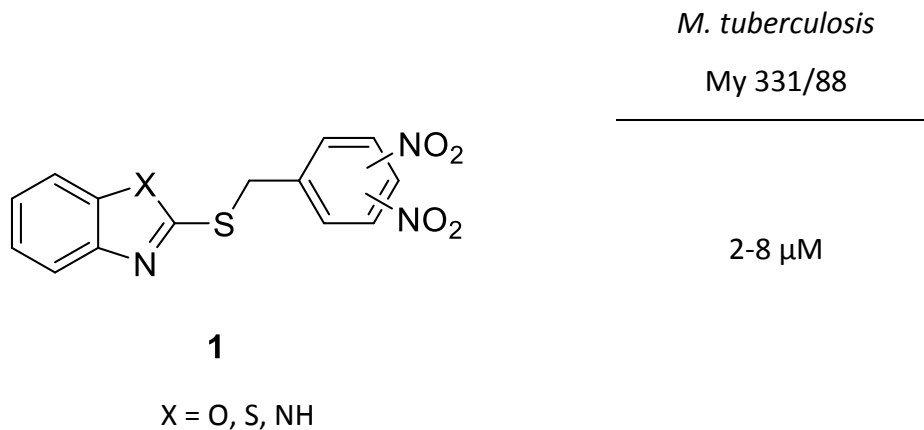


**Obrázok 15. Štruktúra Q203**

nachádza v respiračnom reťazci mykobaktérií a iných aktinobaktérií.<sup>29</sup> Q203 účinne blokuje rast *M. tuberculosis* in vitro a v ľudských makrofágoch už pri nižších nanomolárnych koncentráciách.<sup>28</sup>

## 5. Teoretická časť

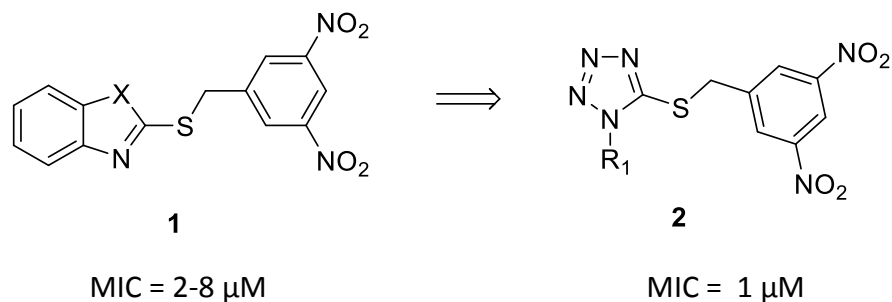
Táto práca naväzuje na predchádzajúcu prácu na katedre bioorganickej a organickej chémie, ktorá bola zameraná na syntézu derivátov tetrazolu a oxadiazolu s potenciálnou antimykobakteriálnou aktivitou. K nim sa dospelo po predchádzajúcej syntéze rôzne substituovaných benzylsulfanyl benzazolov, triazolov a pyridínov, z ktorých bolo zistené, že najvyššiu antimykobakteriálnu aktivitu vykazujú benzazolové deriváty s 2,4- a 3,5-dinitrobenzylsulfanylovým substituentom (Obrázok 16).<sup>30</sup>



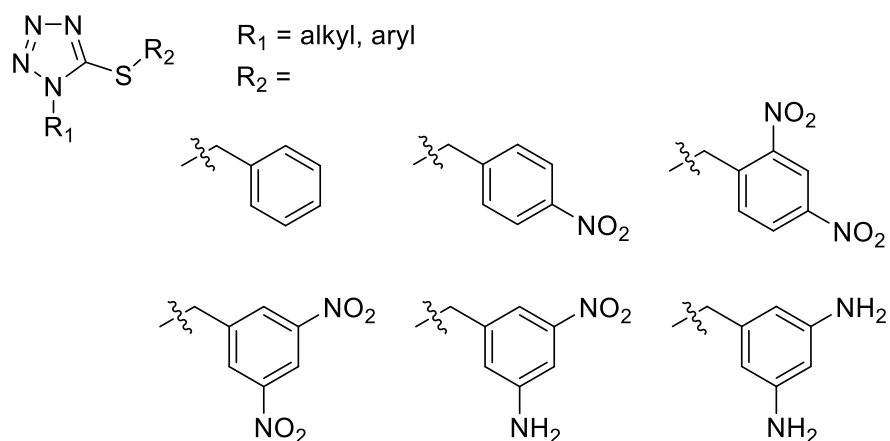
**Obrázok 16. In vitro antimykobakteriálna aktivita 2,4- a 3,5-dinitrobenzylsulfanylových derivátov benzazolu vyjadrená ako MIC ( $\mu$ M)**

### 5.1. 1-Substituované 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a ich izostérne analógy

Aby sa hlbšie preštudovala úloha heterocyklov v antimykrobiálnej aktivite, bol benzazolový heterocyklus nahradený tetrazolovým. Dôvody výberu tetrazolu sú jeho jednoduchá syntéza a pravdepodobne jeho lepšie ADME vlastnosti, navyše substitúcia v polohe 1 umožňuje študovať vzťahy medzi obmenami štruktúry a aktivitou, a tiež optimalizovať vlastnosti cieľových zlúčenín.



V rámci štúdie bolo dokázané, že 2,4- a hlavne 3,5-dinitroderiváty týchto syntetizovaných zlúčenín vykazovali významnú *in vitro* antimykrobiálnu aktivitu proti mykobakteriálnym kmeňom. Ako prototyp pre porovnanie výsledkov aktivity bolo použité antituberkulotikum 1. línie INH. Bolo zistené, že deriváty 5- [(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu a ich bioizostérické analógy s kyslíkom a selénom sú vysoko antimykobakteriálne aktívne. Ich hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) dosiahli 1  $\mu$ M proti *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 a 0,25 -1  $\mu$ M proti šiestim multiliekovo-rezistentným klinicky izolovaným kmeňom *M. tuberculosis*.



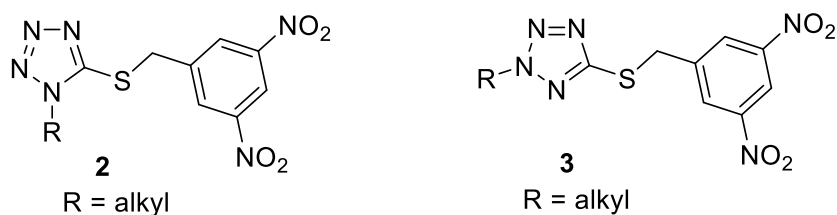
**Obrázok 17. Základné štruktúry na katedre pripravených tetrazolov**

V rámci tejto práce bolo zistené, že prítomnosť dvoch nitroskupín viazaných na benzyl je pre zachovanie vysokej účinnosti nevyhnutná. Čiastočne alebo úplne redukované deriváty takmer úplne antimykobakteriálnu aktivitu stratili. Čo sa týka

polohy nitroskupín, 3,5-dinitroderiváty vykazovali podstatne vyššiu antimykrobiálnu aktivitu než 2,4-dinitroderiváty. Zaujímavosťou je, že izosterická zámena heteroatómu medzi dinitrobenzylom a tetrazolom nemá na aktivitu žiaden významný vplyv. Pokles aktivity nastal až jeho zámenou za čiastočne alebo úplne oxidovaný derivát sulfanylu (sulfinyl, sulfonyl). Bez významnej straty anti-TB vlastností môže byť zamenený substituent  $R_1$ , čo sa môže využiť pre budúcu optimalizáciu pomeru aktivita/toxicita a pre zlepšovanie ADME vlastností týchto sľubných zlúčenín. Na antimykrobiálnu aktivitu má veľký vplyv taktiež lipofilita. U molekúl s amino-, methyl-, alebo karboxylovou substitúciou, ktorá lipofilitu znižuje, došlo k zníženiu alebo až k úplnej strate účinku. Prípravou látok neobsahujúcich tetrazolový kruh bolo dokázané, že jeho neprítomnosť podstatne znižuje antimykrobiálnu aktivitu a tetrazol je teda dôležitým štrukturálnym prvkom týchto zlúčenín. Porovnaním aktivít dinitrosubstituovaného benzazolu (MIC = 2-8  $\mu\text{M}$ ) a dinitrosubstituovaného tetrazolu (MIC = 1  $\mu\text{M}$ ) bolo dokázané, že zámena benzazolu za tetrazol vedie k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity.

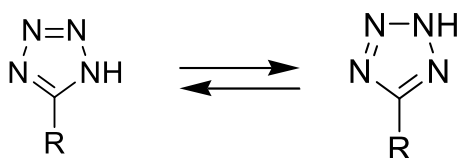
U zlúčenín sa následne testovala selektivita ich účinku zisťovaním ich aktivity proti ôsmim bakteriálnym a ôsmim hubovým kmeňom. Ich selektívny antimykobakteriálny účinok bol potvrdený, keďže všetky zlúčeniny obsahujúce substitúciu 3,5-dinitrobenzylom nevykazovali žiadnu antibakteriálnu ani antimykotickú aktivitu. Ďalej u týchto derivátov neboli pozorované žiadne toxické účinky, nebola zistená žiadna skrížená rezistencia s antituberkulotikami 1. a 2. línie a výsledky ich testovania na cytotoxicitu ukazujú, že majú iba obmedzené účinky na životaschopnosť cicavčích buniek.<sup>30</sup>

## 5.2. 1,5- a 2,5-Disubstituované tetrazoly



**Obrázok 18. Obecná štruktúra 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolov**

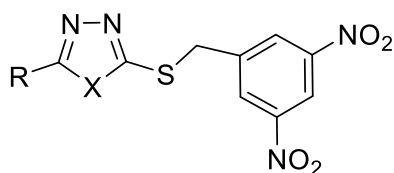
Existencia 1,5- a 2,5- disubstituovaných tetrazolových regioizomérov je podmienená tautomériou 5-substituovaného tetrazolu (5-ST), ktorý vytvára 1*H*- a 2*H*-tautoméry (Obrázok 19).



**Obrázok 19. Tautoméry 5-ST**

Syntéza látok vytvorených substitúciou týchto tautomérov a ich následné skúmanie dokázalo, že pre ne platia rovnaké charakteristiky, aké sú popísané v kapitole 4.1. Posúdením polohy alkylového substituentu bolo ale zistené, že 2-regioizoméry vykazujú vyššiu aktivitu než 1-regioizoméry, ktorých aktivita je navyše viac náchylná aj na typ tetrazolového substituentu. Z porovnania *in vitro* toxicity medzi 1- a 2-regioizomérmí vyplynulo, že 2-regioizoméry vykazujú toxicitu nižšiu. Syntetizované látky boli tiež testované na ich mutagénnu aktivitu. Ukázalo sa, že deriváty s 3,5-dinitrobenzylovou substitúciou na heteroatóme nie sú spojené s mutagénnou aktivitou typu posunu čítacieho rámca či výmeny nukleových báz.<sup>31</sup>

### 5.3. 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoly a thiadiazoly



**Obrázok 20. Obecná štruktúra 2,5-disubstituovaných oxadiazolov (1) a thiadiazolov (2)**

Ďalšia práca naviazala na predchodzie pripravené tetrazolové zlúčeniny vytvorením ich možných bioizosterných analógov. Bolo dokázané, že väčšina z pripravených 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolov a thiadiazolov dosiahla výrazne vyššiu antimykobakteriálnu aktivitu než súčasné antituberkulotiká 1. línie, navyše boli účinné proti klinicky izolovanej *M. kansasii* i proti INH-rezistentnej *M. kansasii*. Tieto zlúčeniny tiež vykázali vynikajúcu aktivitu proti všetkým šiestim kmeňom multiliekovo-rezistentnej *M. tuberculosis* a žiadnu skríženú rezistenciu s antituberkulotikami 1. a 2. línie. Z porovnania aktivity dinitrobenzylsulfanyl-tetrazolov **2** a **3** (MIC = 1  $\mu$ M), 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolov **4** (MIC = 0,03-1  $\mu$ M) a 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-thiadiazolov **5** (MIC = 0,03-4  $\mu$ M) bolo zistené, že bioizosternou zámenou tetrazolu za oxadiazol a thiadiazol došlo k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity.

**Tabuľka 3. Porovnanie aktivity 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolov a thiadiazolov s INH**

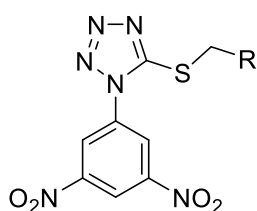
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
<b>4</b>	0,03 - 1	4 - 500	0,06 - 4	0,06 - 16
<b>5</b>	0,03 - 4	8 - 125	0,125 - 4	0,125 - 8
<b>INH</b>	0,5	>250	>250	4



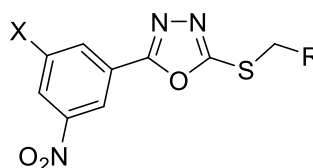
I u týchto zlúčenín má substituent R zanedbateľný vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu, určuje ale fyzikálne-chemické vlastnosti skúmaných zlúčenín. Mykobakteriálna selektivita pripravených derivátov bola dokázaná tým, že neprejavila žiadnu aktivitu na 8 bakteriálnych kmeňoch a 8 hubových kmeňoch (5 kvasinkových a 3 plesňových). Ďalej bolo testami cytotoxicity zistené, že tieto látky nemajú takmer žiaden vplyv na životaschopnosť cicavčích buniek. Pripravené látky taktiež nevykazujú žiaden efekt mutagénny, takže vo všeobecnosti nie sú spojené ani s posunom čítacieho rámca ani s výmenou nukleových báz. Hlbším skúmaním zlúčenín bolo tiež zistené, že tieto látky majú pravdepodobne nový mechanizmus účinku zameraný na syntézu mykobakteriálnych nukleových kyselín.<sup>32</sup>

#### 5.4. Reverzné analógy 1,5-disubstituovaných tetrazolov a 2,5-disubstituovaných oxadiazolov

Cieľom naväzujúcej práce na fakulte bioorganickej a organickej chémie bolo zistiť, aký vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu má pripojenie 3,5-dinitrofenylovej skupiny priamo na heterocyklus. Takto vznikla séria látok chemickej štruktúry 5-alkylsulfanyl-1-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolu a 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolu.



6



7

R = H, alkyl, aryl

X = -NO<sub>2</sub>, -OH, -OOCCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NHOCCH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>

**Obrázok 21. Obecná štruktúra 1,5-disubstituovaných tetrazolov a 2,5-disubstituovaných oxadiazolov**

Pripojenie 3,5-dinitrofenylovej skupiny priamo na dusík v tetrazole viedlo až k 4-násobne vyššej antimykobakteriálnej aktivite než u materských zlúčenín. Reverzné analógy 1,3,4-oxadiazolov vykazujú vynikajúcu aktivitu porovnateľnú s aktivitou parentných 1,3,4-oxadiazolov. Porovnanie tetrazolových a 1,3,4-oxadiazolových derivátov **6** a **7** ukázalo, že aj v tomto prípade má typ heterocyklu významný vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu: reverzné analógy 1,3,4-oxadiazolov **7** vykazujú opäť vyššiu aktivitu než tetrazolové zlúčeniny **6**, z čoho vyplýva, že je prítomnosť 1,3,4-oxadiazolu výrazne prospešná.

**Tabuľka 4. Porovnanie aktivít reverzných analógov 1,5-disubstituovaných tetrazolov a 3,5-dinitrofenyl-1,3,4-oxadiazolov s INH**

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
<b>6</b>	0,25 – 1	4 - 32	1 - 2	0,5 - 2
<b>7</b>	0,03 - 0,5	2 – 250	0,03 – 2	0,03 - 8
<b>INH</b>	0,5	>250	>250	4

V rámci štúdie vzťahu medzi štruktúrou a antimykobakteriálnou aktivitou 1,3,4-oxadiazolov **6** bolo stanovené, že účinnosť zlúčenín je silne ovplyvnená lipofilitou R substituentu. Preto je značne nižšia aktivita spojená s prítomnosťou substituentov znižujúcich lipofilitu, ako sú methylsulfanyl deriváty a thiolové deriváty. Úplna strata aktivity sa u 1,3,4-oxadiazolov objavila, keď bola jedna nitroskupina nahradená hydroxy skupinou, amino skupinou alebo ich acetyl derivátmi, potvrdzujúc tak nutnosť prítomnosti oboch nitroskupín na fenyllovej časti pre vysokú antimykobakteriálnu aktivitu. Prekvapivo ale zlúčeniny obsahujúce 3-nitro-5-trifluoromethylfenylový fragment na 1,3,4-oxadiazole vykázali aktivity podobné aktivitám dinitrofenylderivátov 1,3,4-oxadiazolov.

Pripravené látky preukázali vynikajúce anti-TB aktivity, vrátane účinku proti replikujúcim kmeňom *M. tuberculosis* i multiliekovo a extenzívne rezistentným

kmeňom a žiadne skrížené rezistencie s ostatnými používanými antituberkulotikami. Testy na cytotoxicitu proti 8 bakteriálnym kmeňom (4 grampozitívne koky a 4 gramnegatívne tyčky) a 8 hubovým kmeňom (5 kvasinkových a 3 plesňové) ďalej potvrdili, že žiadna zo zlúčenín neprejavuje antibakteriálne ani antimykotické účinky a taktiež majú tieto látky zanedbateľný efekt na životaschopnosť cicavčích buniek.<sup>33</sup>

## 6. Ciele práce

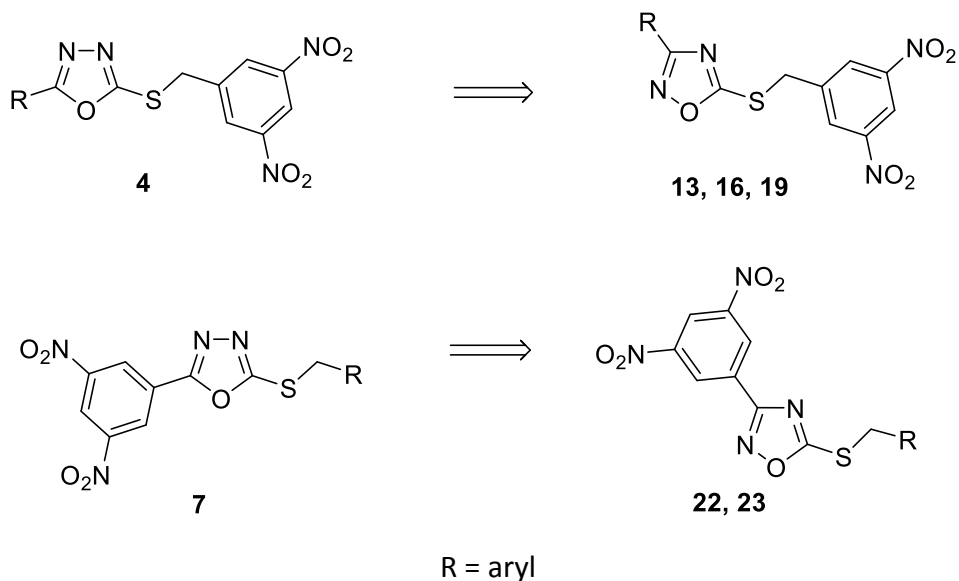
Touto prácou bolo naviazané na objavené látky s vysokou antimykobakteriálnou aktivitou v predchádzajúcich prácach na katedre bioorganickej a organickej chémie. Predchádzajúce pripravené série:

- 1-alkyl/aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a 2-alkyl/aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-2*H*-tetrazoly **3**
- 2-alkyl/aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1,3,4-oxadiazoly **4** a 2-alkyl/aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-5-alkyl/aryl-1,3,4-thiadiazoly **5**
- 1-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazoly **6** a 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazoly **7**

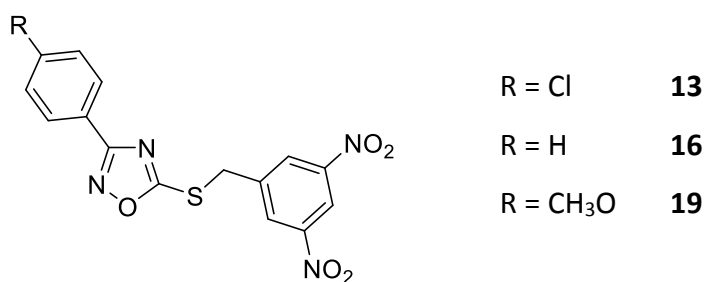
Bolo zistené, že tieto látky majú vysokú antimykobakteriálnu aktivitu, a to aj proti multiliekovo-rezistentným klinicky izolovaným kmeňom *M. tuberculosis*. Tieto látky dokázali vysokú selektivitu účinku tým, že neprejavili žiadnu antibakteriálnu ani antimykotickú aktivitu. Taktiež neprejavili žiadne toxické účinky, nebola zistená žiadna skrížená rezistencia s antituberkulotikami 1. a 2. línie a výsledky ich testovania na cytotoxicitu ukazujú zanedbateľné účinky na životaschopnosť cicavčích buniek. Bolo dokázané, že heterocyklus môže výrazne ovplyvniť účinnosť, čo sa prejavilo zvýšením aktivity zámenou tetrazolu za 1,3,4-oxadiazol. Preto cieľom tejto práce bolo preštudovať, akú aktivitu budú mať zlúčeniny obsahujúce 1,2,4-oxadiazol, a tiež študovať vplyv substituentov na antimykobakteriálnu aktivitu.<sup>31,32,33</sup>

Ako prvá bola pripravená séria zlúčenín bioizostérnou zámenou 1,3,4-oxadiazolu za 1,2,4-oxadiazol a následne boli pripravené ich reverzné analógy (Obrázok 22).

**Obrázok 22. Základná štruktúra pripravovaných látok**

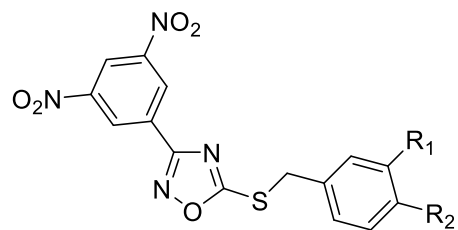


Najprv sa pripravia substituované 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazoly (**13,16,19**). U týchto bioizostérnych analógov sa bude skúmať, či je zachovaná ich *in vitro* antimykobakteriálna aktivita aj v prítomnosti iného heterocyklu (Obrázok 23), a prípadne či bude ovplyvnená zavedením rôznych R substituentov.



**Obrázok 23. Obecný vzorec pripravovaných derivátov 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu**

Následne budú syntetizované ich reverzné analógy s cieľom zistiť, aký vplyv na *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu bude mať zavedenie 3,5-dinitrofenylovej skupiny priamo na 1,2,4-oxadiazol (Obrázok 24).



**22:** R1 = R2 = H

**23:** R1 = R2 = Cl

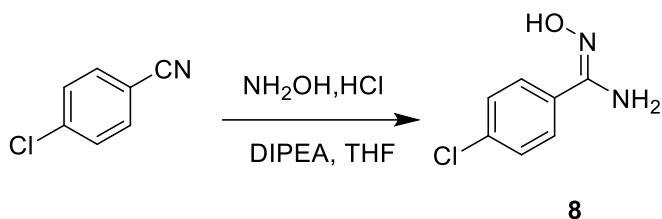
**Obrázok 24. Obecná štruktúra reverzných derivátov 3-(3,5-dinitrofenyl)-5-(benzylsulfanyl)-1,2,4-oxadiazolov**

## 7. Experimentálna časť

### 7.1. Príprava 3-(4-chlorfenyl)-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu (13)

#### 7.1.1. Príprava 4-chlor-*N'*-hydroxybenzamidoximu (8)

Schéma



K roztoku 4-chlorbenzonitrilu (5g, 36,3 mmol) v 100 ml tetrahydrofuranu (THF) bol pridaný *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) (7,5 ml, 58 mmol) a nakoniec hydroxylamín hydrochlorid (3,78 g, 54,5 mmol). Reakcia bola zahrievaná k varu na olejovej lázni 3 hodiny za stáleho miešania. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze bola kontrolovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes odparená, k surovému produktu bola pridaná voda, produkt bol prefiltrovaný a rekryštalizovaný z etanolu.

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 170,6 g/mol

Teoretický výťažok: 6,2 g

Praktický výťažok: 93 % (5,79 g)

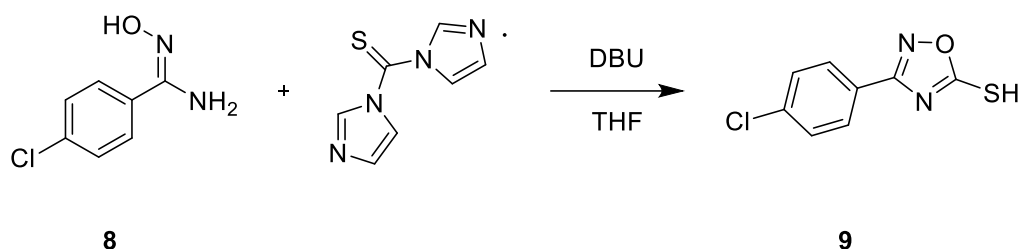
Teplota topenia: 112-115 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,72 (s, 1H), 7,68 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7,43 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 5,86 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  150,08, 133,61, 132,37, 128,30, 127,30.

### 7.1.2. Príprava 3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (9)

Schéma



Metóda A:

K roztoku 4-chlor- $N'$ -hydroxybenzamidoximu (**8**) (0,5g, 2,93 mmol) v 20 ml suchého THF pod argónom bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,783g, 4,4 mmol) a 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-én (DBU) (1,75 ml, 11,7 mmol). Reakcia prebiehala za chladenia v ľadovej lázni 7 hodín. Zmes bola miešaná na magnetickej miešačke. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Produkt zostal rozpustený vo vodnej fáze vo forme thiolátu, následne bola vodná fáza okyselená 35% HCl do pH 2 a extrahovaná pomocou 40 ml ethylacetátu. Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia produktu (mobilná fáza: hexan - ethylacetát – kyselina octová = 40:10:1).



*Metóda B:*

K roztoku 4-chlor-*N'*-hydroxybenzamidoximu (**8**) (0,5g, 2,93 mmol) v 20 ml suchého THF pod argónom bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,783g, 4,4 mmol) a DBU (1,75 ml, 11,7 mmol). Reakcia bola zahrievaná k varu na olejovej lázni 5 hodín za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Produkt zostal rozpustený vo vodnej fázy vo forme thiolátu, následne bola vodná fáza okyselená 35% HCl do pH 2 a extrahovaná pomocou 40 ml ethylacetátu. Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia produktu (mobilná fáza: hexan - etylacetát – kyselina octová = 40:10:1).

Vzhľad: svetlo béžová kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 212,65 g/mol

Teoretický výťažok: 0,623 g

Praktický výťažok reakcie A: 72 % (0,45g)

Praktický výťažok reakcie B: 71 % (0,44g)

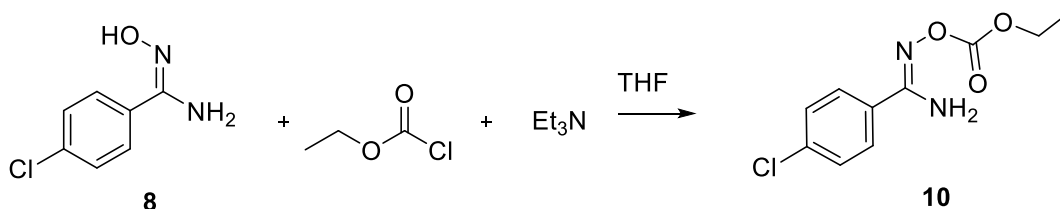
Teplota topenia: 221-224 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton) δ 7,99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7,68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton) δ 158,22, 138,23, 129,69, 128,66, 121,03.

### 7.1.3. Príprava 4-chloro-*N'*-((ethoxykarbonyl)oxy)benzimidamidu (10)

Schéma



K roztoku 4-chloro-*N'*-hydroxybenzamidoximu (**8**) (1 g, 5,9 mmol) v 20 ml suchého THF bol pridaný triethylamín (1 ml, 7 mmol). Banka sa uzavrela pod argónom a následne sa pridal ethylchloroformiát (0,6 ml, 6,5 mmol). Reakčná zmes bola miešaná na magnetickej miešačke. Najprv reakcia prebiehala 30 minút pri chladení v ľadovej lázni. Podľa tenkovrstvovej chromatografie bolo zistené, že reakcia v takýchto podmienkach neprebíhala. Následne bola reakcia miešaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, prefiltrovala a následne bola odparená na vakuovej odparke. Produkt bol bez čistenia použitý do nasledujúcej reakcie.

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 242,66 g/mol

Teoretický výťažok: 1,42 g

Praktický výťažok: 83 % (1,18 g)

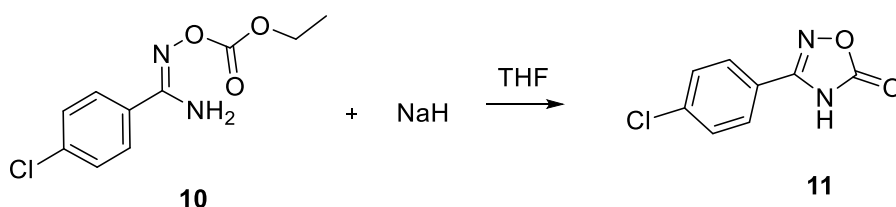
Teplota topenia: 128-131°C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone)  $\delta$  7,82 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7,51 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 6,37 (s, 2H), 4,24 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1,31 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone)  $\delta$  156,26, 154,33, 136,81, 131,44, 129,41, 129,23, 64,41, 14,60.

#### 7.1.4. Príprava 4H-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-onu (11)

Schéma



K roztoku 4-chloro-*N'*-((ethoxykarbonyl)oxy)benzimidamidu (**10**) (1,17 g, 4,8 mmol) v 20 ml suchého THF bol pridaný hydrid sodný (0,23 g, 9,6 mmol) a banka sa uzavrela pod argónom. Reakčná zmes bola miešaná na magnetickej miešačke 19 hodín pri laboratórnej teplote 19 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol rozpustený vo vode a okyselený 35% HCl do pH 2. Produkt sa v kyslom prostredí vyzrážal, následne bola na jeho izoláciu použitá metóda extrakcie pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola sfiltrovaná a potom bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - ethylacetát = 2:1).

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 196,6 g/mol

Teoretický výťažok: 0,95 g

Praktický výťažok: 77 % (0,73 g)

Teplota topenia: 199-202 °C

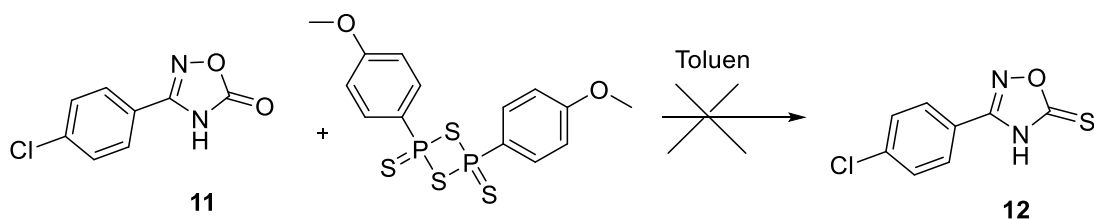
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, aceton)  $\delta$  7,91 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 7,66 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, aceton)  $\delta$  160,15, 157,32, 138,52, 130,35, 128,65, 123,42.

Pri pokuse o rovnaký produkt reakciou roztoku 4-chloro-*N'*-((ethoxykarbonyl)oxy)benzimidamidu v toluéne s methoxidom sodným, bolo pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1) zistené, že sa daný produkt nepodarilo pripraviť.

#### 7.1.5. Príprava 4*H*-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thionu (**12**)

Schéma

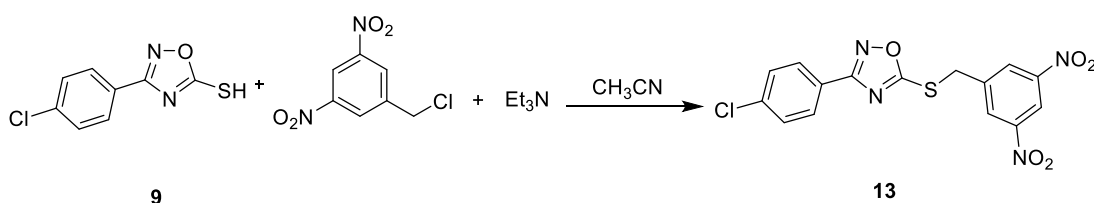


K roztoku látky 4*H*-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-onu (**11**) (0,3 g, 1,53 mmol) v 10 ml toluénu bol pridaný Lawessonov reagent (0,62 g, 1,53 mmol). Reakcia bola 6 dní zahrievaná k varu na magnetickej miešačke v olejovej lázni. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát – kyselina octová (30:10:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes sfiltrovaná a filtrát bol extrahovaný pomocou nasýteného roztoku hydrogénuhličitanu sodného. Vodná fáza bola na prečistenie extrahovaná pomocou éteru (1:1). Následne bola prečistená

vodná fáza okyselená 35% HCl do pH 2 a 2 x extrahovaná pomocou ethylacetátu (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola sfiltrovaná a odparená na vakuovej odparke. Keďže na TLC zhášal produkt aj použitý éter na extrakciu, tak bol 1 x vytrepaný vodou a následne odparený na vakuovej odparke. Podľa NMR oboch produktov však nedošlo danou reakciou k zmene kyslíku na síru.

### 7.1.6. Príprava 3-(4-chlorfenyl)-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu (13)

*Schéma*



K roztoku 3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**9**) (0,20 g, 0,94 mmol) v 10 ml acetonitrilu bolo pridané alkylačné činidlo 3,5-dinitrobenzylchlorid (0,185 g, 0,85 mmol) a triethylamín (0,104 g, 1,03 mmol). Reakcia bola miešaná na magnetickej miešačke najprv pri laboratórnej teplote 1,5 hodiny. Pomocou tenkovrstvovej chromatografie bolo zistené, že reakcia v takýchto podmienkach neprebíhala. Následne bola teda reakcia zahrievaná k varu 18 hodín na magnetickej miešačke v olejovej lázni pod spätným chladičom. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola odfiltrovaná a následne odparená s prídavkom silikagelu. Bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 5:1).

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 392,77 g/mol

Teoretický výťažok: 0,34 g

Výťažok: 98 % (0,33 g)

Teplota topenia: 173 – 175 °C

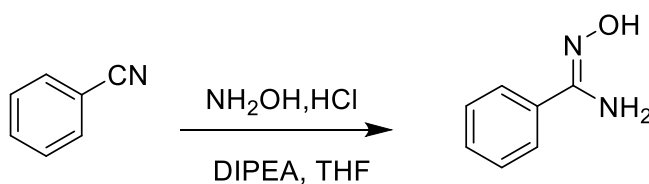
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,93 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H), 8,73 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 8,01 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7,64 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 4,89 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  177,87, 167,15, 148,04, 141,50, 136,84, 130,22, 129,60, 129,03, 124,55, 118,14, 34,74.

## 7.2. Príprava 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-fenyl-1,2,4-oxadiazolov (16)

### 7.2.1. Príprava *N'*-hydroxybenzimidamidu (14)

Schéma



14

K roztoku benzonitrilu (3g, 29,1 mmol) v 50 ml THF bol pridaný N,N-diisopropylethylamin (DIPEA) (8 ml, 46,6 mmol) a hydroxylamín hydrochlorid (3,04 g, 43,7 mmol). Reakcia bola 6 hodín zahrievaná k varu na magnetickej miešačke v olejovej lázni. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze bola kontrolovaná

pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola sfiltrovaná, následne odparená s prídavkom silikagelu. Bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 3:1).

Vzhľad: biela kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 136,15 g/mol

Teoretický výťažok: 3,96 g

Praktický výťažok: 63 % (2,76 g)

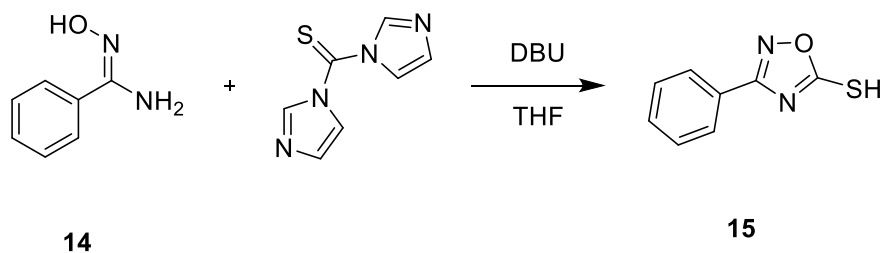
Teplota topenia: 63-66°C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,62 (s, 1H), 7,76 – 7,60 (m, 2H), 7,51 – 7,19 (m, 3H), 5,79 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  151,02, 133,56, 129,06, 128,29, 125,58.

### 7.2.2. Príprava 3-fenyl-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (15)

Schéma



K roztoku *N'*-hydroxybenzimidamidu (**14**) (0,5g, 3,67 mmol) v 10 ml suchého THF bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,98 g, 5,5 mmol) a DBU (2,2 ml, 14,7 mmol). Reakcia prebiehala 24 hodín pri chladení v ľadovej lázni za miešania na magnetickej miešačke. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát – kyselina octová (30:10:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody. Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, sfiltrovaná, odparená na silikágel a produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: hexan – ethylacetát – kyselina octová = 40:10:1).

Vzhľad: béžová kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 178,21 g/mol

Teoretický výťažok: 0,66 g

Praktický výťažok: 70 % (0,46 g)

Teplota topenia: 150-154 °C

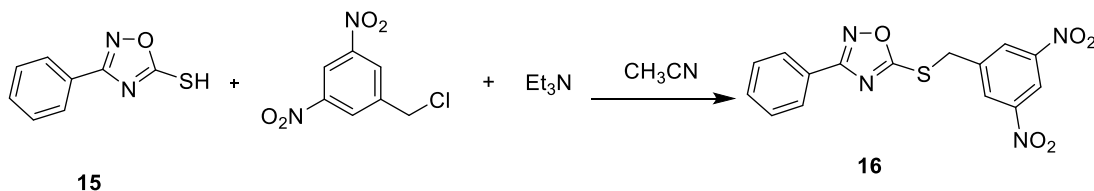
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton) δ 8,01 – 7,93 (m, 2H), 7,75 – 7,67 (m, 1H), 7,67 – 7,55 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton) δ 188,43, 159,55, 133,48, 130,26, 127,72, 122,92.



### 7.2.3. Príprava 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-fenyl-1,2,4-oxadiazolu (16)

Schéma



K roztoku 3-fenyl-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**15**) (0,20 g, 1,12 mmol) v 10 ml acetonitrilu bolo pridané alkylačné činidlo 3,5-dinitrobenzylchlorid (0,221 g, 1,02 mmol) a triethylamín (0,124 g, 1,23 mmol). Reakčná zmes bola miešaná na magnetickej miešačke najprv pri laboratórnej teplote 1 hodinu. Podľa tenkovrstvovej chromatografie bolo zistené, že v takýchto podmienkach stále zostáva časť východzej látky. Preto bola reakcia následne 2 hodiny zahrievaná k varu v olejovej lázni. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (2:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola sfiltrovaná, následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikagelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 2:1).

Vzhľad: béžová kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 358,33 g/mol

Teoretický výťažok: 0,37 g

Praktický výťažok: 31 % (0,12 g)

Teplota topenia: 124-127°C

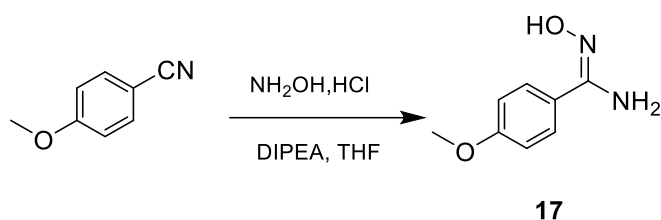
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, acetone)  $\delta$  9,01 (s, 2H), 8,86 (s, 1H), 8,09 – 8,06 (m, 2H), 7,64 – 7,52 (m, 3H), 5,00 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, acetone)  $\delta$  178,26, 169,10, 149,35, 142,65, 132,51, 130,89, 129,93, 128,10, 127,07, 118,80, 35,84.

### 7.3. Příprava 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazolov (19)

#### 7.3.1. Příprava *N'*-hydroxy-4-methoxybenzimidamidu (17)

Schéma



K roztoku *p*-methoxybenzonitrilu (2 g, 15,02 mmol) v 30 ml THF bol pridaný *N,N*-diisopropylethylamín (4,11 ml, 24,03 mmol) a hydroxylamín hydrochlorid (1,57 g, 22,6 mmol). Reakcia bola 37 hodín zahrievaná k varu na magnetickej miešačke v olejovej lázni. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze bola kontrolovaná pomocou tenkovrstvej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan – ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol 2 x extrahovaný pomocou chloroformu a vody (1:1). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, zfiltrovaná a následne odparená s prídavkom silikágelu. Bola prevedená stĺpcová chromatografia (postupné zrýchľovanie mofilnej fázy z: hexan – ethylacetát (5:1), až k čistému ethylacetátu).

Vzhľad: svetlo šedá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 166,18 g/mol

Teoretický výťažok: 2,5 g

Výťažok: 30 % (0,75 g)

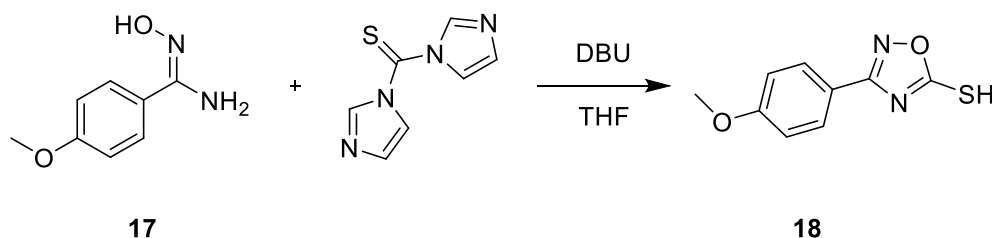
Teplota topenia: 121-123 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,45 (s, 1H), 7,60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6,92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 5,71 (s, 2H), 3,76 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  160,01, 150,80, 128,35, 126,91, 125,96, 113,65, 55.33.

### 7.3.2. Príprava 3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**18**)

Schéma



K roztoku *N'*-hydroxy-4-methoxybenzimidamidu (**17**) (0,7g, 4,2 mmol) v 10 ml suchého THF bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (1,13 g, 6,3 mmol) a DBU (2,51 ml, 16,8 mmol). Reakcia prebiehala 18 hodín pri chladení v ľadovej lázni za miešania na magnetickej miešačke. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát – kyselina octová (40:10:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody. Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom

sodným, sfiltrovaná, odparená na silikágel a produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: hexan – ethylacetát – kyselina octová = 40:10:1).

Vzhľad: svetlošedá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 208,24 g/mol

Teoretický výťažok: 0,88 g

Praktický výťažok: 87 % (0,76 g)

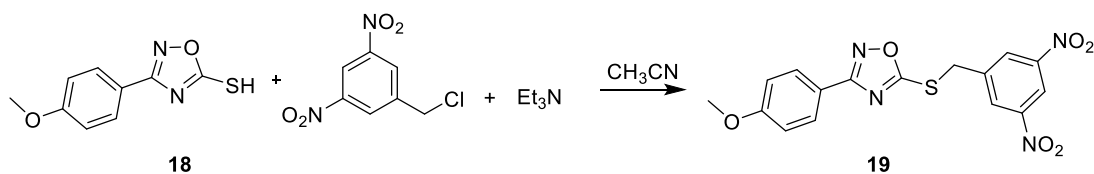
Teplota topenia: 149-153 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,83 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 7,13 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  187,53, 162,67, 158,78, 128,84, 115,07, 113,88, 55,76.

### 7.3.3. Príprava 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazolu (19)

Schéma



K roztoku 3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**18**) (0,7 g, 3,4 mmol) v 20 ml acetonitrilu bolo pridané alkylačné činidlo 3,5-dinitrobenzylchlorid (0,66 g, 3,06 mmol) a triethylamín (0,37 g, 3,67 mmol). Reakcia bola 15 hodín zahrievaná k varu v olejovej lázni. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej

chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (6:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (1:1). Organická fáza sa vysušila bezvodým síranom sodným, bola sfiltrovaná, následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikagelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 6:1).

Vzhľad: svetlobéžová kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 388,35 g/mol

Teoretický výťažok: 1,18 g

Praktický výťažok: 85 % (1,01 g)

Teplota topenia: 155-156 °C

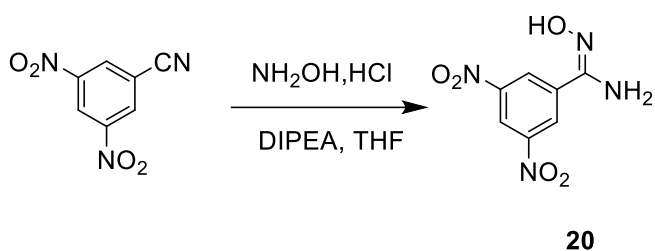
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,92 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 2H), 8,76 – 8,56 (m, 1H), 7,93 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7,09 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4,87 (s, 2H), 3,84 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  177,11, 167,63, 162,13, 148,01, 141,64, 130,21, 128,97, 118,10, 117,87, 114,80, 55,62, 34,68.

## 7.4. Príprava 5-alkylsulfanyl-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolov (22,23)

### 7.4.1. Príprava *N'*-hydroxy-3-(3,5-dinitrobenzimidamidu) (20)

Schéma



K roztoku 3,5-dinitrobenzonitrilu (1g, 5,2 mmol) v 30 ml THF, bol pridaný *N,N*-diisopropylethylamin (1,4 ml, 8,3 mmol) a nakoniec hydroxylamín hydrochlorid (0,539g, 7,8 mmol). Reakcia bola 3 hodiny zahrievaná k varu na magnetickej miešačke olejovej lázni pod spätným chladičom. Priebeh reakcie a čistota produktu pri syntéze bola kontrolovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a vody (1:1). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne odparená a vyčistená rekryštalizáciou z ethanolu.

Vzhľad: nažltlá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 226,15 g/mol

Teoretický výťažok: 1,17 g

Praktický výťažok: 64 % (0,753 g)

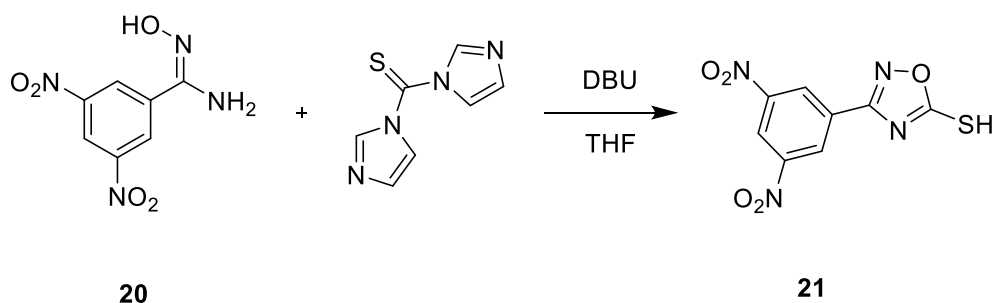
Teplota topenia: 190-195 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  10,29 (s, 1H), 8,88 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 8,80 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 6,36 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  148,27, 147,90, 136,45, 125,27, 118,51.

#### 7.4.2. Príprava 3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**21**)

Schéma



K roztoku *N'*-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamidu (**20**) (0,4g, 1,77 mmol) v 20 ml suchého THF pod argónom pri chladení v ľadovej lázni bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,473g, 2,65 mmol) a DBU (1,06ml, 7,07 mmol). Zmes bola miešaná na magnetickej miešačke 12 hodín. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (3:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol rozpustený v 25 ml vody, okyselený 35% HCl do pH 2 a extrahovaný do 40 ml ethylacetátu. Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, odparená na silikágel a produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie (mobilná fáza: hexan - etylacetát – kyselina octová = 20:10:1).

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 268,2 g/mol

Teoretický výťažok: 0,47 g

Praktický výťažok: 44 % (0,210 g)

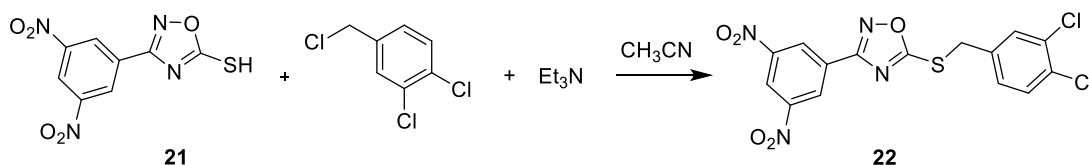
Teplota topenia: 139-141 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton) δ 9,20 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton) δ 188,20, 157,49, 150,07, 127,93, 126,42, 122,60.

### 7.4.3. Príprava 5-(3,4-dichlorbenzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu (22)

Schéma



K roztoku 3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**21**) (0,21g, 0,78 mmol) v 10 ml acetonitrilu bolo pridané alkylačné činidlo 3,4-dichlorbenzylchlorid (0,118g, 0,60 mmol) a triethylamín (0,079g, 0,78 mmol). Reakcia bola zahrievaná k varu na olejovej lázni 2 hodiny za stáleho miešania na magnetickej miešačke. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (1:1). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 5:1).

Vzhľad: žltá kryštalická látka



Molárna hmotnosť: 427,21 g/mol

Teoretický výťažok: 0,26 g

Praktický výťažok: 68 % (0,176 g)

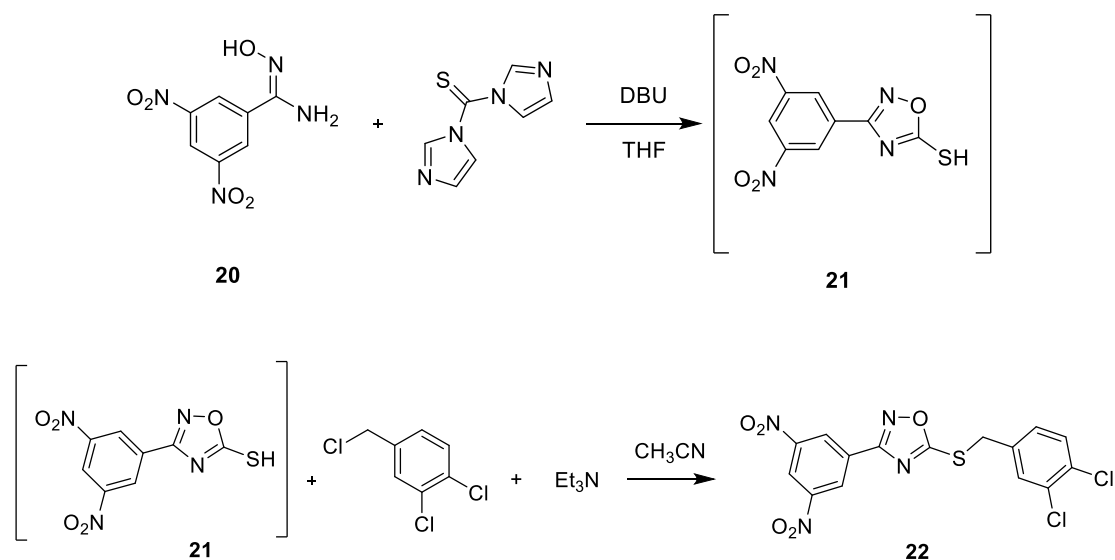
Teplota topenia: 135-137 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, aceton)  $\delta$  9,14 (s, 3H), 7,87 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7,63 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1H), 7,58 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 4,80 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR 13C NMR (126 MHz, aceton)  $\delta$  180,44, 166,67, 150,09, 138,24, 132,73, 132,31, 132,26, 131,61, 130,43, 130,22, 127,76, 121,80, 36,21.

#### 7.4.4. Príprava 5-(3,4-dichlorbenzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu ONE POT reakciou (22)

Schéma



K roztoku *N*'-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamidu (**20**) (0,2g, 0,88 mmol) v 20 ml suchého THF pod argónom bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,236g, 1,32 mmol) a DBU (0,53 ml, 3,54 mmol). Reakcia bola miešaná na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote 75 minút. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (3:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení prvej reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol rozpustený v 25 ml vody, okyselený 35% HCl do pH 2 a extrahovaný do 20 ml ethylacetátu. Vyextrahovanú látku sme vysušili bezvodým síranom sodným, prefiltrovali a rozpúšťadlo odparili. Surový produkt bol rozpustený 5 ml acetonitrilu, pridalo sa alkylačné činidlo 3,4-dichlorbenzylchlorid (0,133g, 0,68 mmol) a triethylamín (0,089g, 0,88 mmol). Reakcia bola zahrievaná na olejovej lázni 1 hodinu k varu za stáleho miešania. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení druhej reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (2:1). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - ethylacetát = 5:1).

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 427,21 g/mol

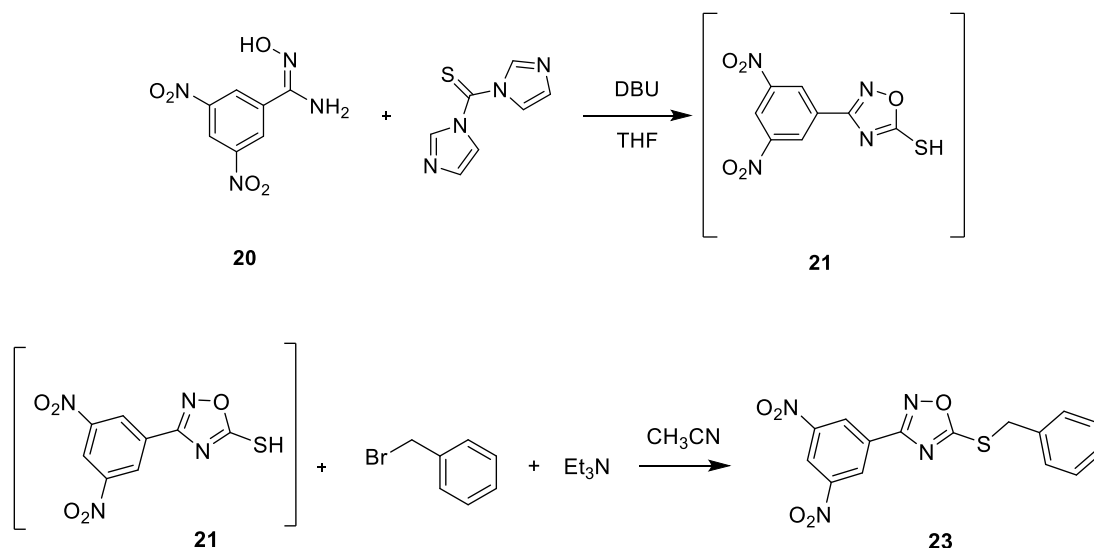
Teoretický výťažok: 0,38 g

Praktický výťažok: 49 % (0,184 g)

Teplota topenia: 135-137 °C

#### 7.4.5. Príprava 5-(benzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu ONE POT reakciou (23)

Schéma



K roztoku *N'*-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamidu (**20**) (0,2g, 0,88 mmol) v 20 ml suchého THF pod argónom bol pridaný 1,1'-thiokarbonyldiimidazol (0,236g, 1,32 mmol) a DBU (0,53 ml, 3,54 mmol). Reakcia bola miešaná na magnetickej miešačke pri laboratórnej teplote 75 minút. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (3:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení prvej reakcie bola reakčná zmes odparená, surový produkt bol rozpustený v 25 ml vody, okyselený 35% HCl do pH 2 a extrahovaný do 20 ml ethylacetátu. Roztok extrahovanej látky sme vysušili bezvodým síranom sodným, prefiltrovali a rozpúšťadlo odparili. Surový produkt bol rozpustený 5 ml acetonitrilu, pridalo sa alkylačné činidlo benzylbromid (0,08 ml, 0,68 mmol) a triethylamín (0,089g, 0,88 mmol). Reakcia bola zahrievaná na olejovej lázni 1 hodinu k varu za stáleho miešania. Priebeh reakcie bol monitorovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie za použitia TLC platničiek v mobilnej fáze hexan - ethylacetát (5:1). Detekcia bola prevedená UV lampou. Po skončení druhej reakcie bola reakčná zmes odparená, produkt bol extrahovaný pomocou ethylacetátu

a nasýteného roztoku uhličitanu sodného (1:1). Organická fáza bola vysušená bezvodým síranom sodným, odfiltrovaná, následne bola reakčná zmes odparená s prídavkom silikágelu a bola prevedená stĺpcová chromatografia (mobilná fáza: hexan - etylacetát = 5:1). Pripravená látka ale obsahovala nečistoty, ktoré neboli dočistené, preto nebola meraná teplota topenia a  $^{13}\text{C}$  spektrum.

Vzhľad: žltá kryštalická látka

Molárna hmotnosť: 358,33 g/mol

Teoretický výťažok: 0,317 g

Praktický výťažok: 28 % (0,09 g)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, aceton)  $\delta$  9,16 (d,  $J = 2.1$  Hz, 2H), 9,15 – 9,12 (m, 1H), 7,66 – 7,60 (m, 2H), 7,44 – 7,33 (m, 3H), 4,80 (s, 2H).

## 8. Výsledky a diskusia

Cieľom práce bola syntéza izostérnych derivátov skôr študovaných 2-alkyl/aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazolov (**4**) a 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolů (**7**), ktoré vykazujú vynikajúcu antituberkulotickú aktivitu. Táto diplomová práca bola zameraná na syntézu derivátov 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolov (**13,16,19**) a reverzných analógov 5-alkylsulfanyl-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolov (**22,23**).

V prvom kroku bolo nutné pripraviť oximy východzích nitrilov (**8,14,17,20**) reakciou vybraných nitrilov s hydroxylamínom hydrochloridom v prítomnosti DIPEA. Požadované oximy boli izolované vo výťažku 30 – 93 % a reakčný čas sa pohyboval od 3 – 37 hodín. Za povšimnutie stojí nízky výťažok a dlhý reakčný čas látky **17**. Ani po opakovaných pokusoch sa ale nepodarilo dosiahnuť vyššieho výťažku alebo nižšieho reakčného času. Dôvodom môžu byť nevhodné reakčné podmienky.

Ďalším krokom bola syntéza 3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-thiolov (**9,15,18,21**). Izolované oximy (**8,14,17,20**) podliehali reakcii s 1,1'-thiokarbonyldiimidazolom v prítomnosti DBU. 1,2,4-oxadiazol-5-thioly (**9,15,18,21**) boli získané vo výťažku 44 – 87 % a reakčný čas sa pohyboval od 5 – 24 hodín. Pri príprave 3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-thiolu (**9**) bol vyskúšaný vplyv rôznych reakčných teplôt na hodnotu výťažku. Porovnaním látok **9a** a **9b**, pripravených rôznymi metódami bolo ale zistené, že zmena reakčných teplôt nemala na výťažok žiaden vplyv.

Pokúšali sme sa aj o inú metódu prípravy 1,2,4-oxadiazol-5-thiolov: oxim reagoval s ethylchloroformiátom za vzniku 4-chloro-N'-((ethoxykarbonyl)oxy)benzimidamidu (**10**), nasledovala cyklizácia látky **10** hydridom sodným za vzniku 4H-3-(4-chlorfenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-onu (**11**) a ďalej bola plánovaná zámena karbonylovej skupiny na 1,2,4-oxadiazol-5-onu za thiokarbonylovú reakciou pomocou Lawessonového činidla. Posledná reakcia ale neprebíhala a nedošlo k syntéze požadovaného 1,2,4-oxadiazol-5-thiolu.

Alkyláciou pripravených thiolov alkylačnými činidlami v prítomnosti triethylamínu boli pripravené konečné produkty. Najprv boli pripravené priame deriváty 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolov, ktoré boli po čistení izolované pomocou stĺpcovej chromatografie vo výťažku 31 - 98 %.

➤ Pripravené priame analógy:

- 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-fenyl-1,2,4-oxadiazol (**16**)
- 3-(4-chlorfenyl)-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazol (**13**)
- 5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-3-(4-methoxyfenyl)-1,2,4-oxadiazol (**19**)

Ďalej boli pripravené deriváty 5-aryl-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolov (**22,23**), teda reverzných analógov. U nich bolo zistené, že zatiaľ čo výťažok konečného produktu postupnými reakciami dosiahol iba 30 %, reakcia ONE POT dosiahla výťažku 49 %. Z toho vyplýva, že pre priame deriváty je výhodná syntéza postupnými reakciami a pri reverzných derivátoch je výhodné použitie reakcií ONE POT. Konečné výťažky ONE POT reakciou pripravených reverzných analógov boli od 28 – 49 % a reakčný čas bol 135 minút. Ďalšou nevýhodou prípravy reverzných analógov je vznik väčšieho množstva vedľajších produktov, čo vedie k dlhšiemu čisteniu látok. Aj preto je využitie reakcií ONE POT prínosom.

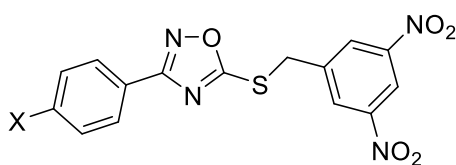
➤ Pripravené reverzné analógy :

- 5-((3,4-dichlorbenzyl)sulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol (**22**)
- 5-(benzylsulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol (**23**)

## 8.1. Testovanie antimykobakteriálnej aktivity *in vitro*

U štyroch pripravených zlúčenín bola hodnotená *in vitro* antimykobakteriálna aktivita voči *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a *M. avium* CNCTC My 330/88. Tieto kmene boli poskytnuté Českou národnou zbierkou typových kultúr (ČNSTK). Štvrtým testovaným kmeňom bol klinický izolát *M. kansasii* 6509/96. Pre hodnotenie *in vitro* antimykobakteriálnej aktivity bola použitá mikrometóda pre stanovenie minimálnych inhibičných koncentrácií liekov v šulovej pôde v plastických P-doštičkách. Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO (dimetylsulfoxid) a nanesené na šulovu pôdu v koncentráciách 500, 250, 125, 62, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 a 0.03  $\mu\text{mol/l}$ . Vzorky boli následne inkubované pri 37 °C u *M. kansasii* po dobu 7, 14 a 21 dní a u *M. tuberculosis* a *M. avium* po dobu 14 a 21 dní. Antimykobakteriálna aktivita *in vitro* bola vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) v  $\mu\text{mol/l}$ . Ide o hodnotu najnižšej koncentrácie látky v  $\mu\text{mol/l}$ , ktorá viditeľne inhibuje rast mykobaktérií. Ako porovnávací štandard antimykobakteriálnej aktivity *in vitro* bol použitý INH.

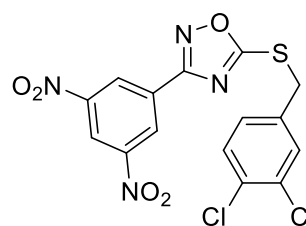
**Tabuľka 5. *In vitro* antimykobakteriálna aktivita vybraných pripravených zlúčenín**



X = Cl      **13**

X = H        **16**

X = CH<sub>3</sub>O   **19**



**22**

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
<b>13</b>	0,5 / 1	250 / 250	1 / 2 / 4	1 / 2 / 4
<b>16</b>	0,5 / 1	250 / 250	0,5 / 1 / 1	-
<b>19</b>	0,5 / 0,5	250 / 250	0,5 / 1 / 2	-
<b>22</b>	2 / 4	125 / 125	4 / 8 / 16	4 / 8 / 8
<b>INH</b>	<b>0,5 / 1</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>4 / 4 / 4</b>

Z tabuľky 5 možno zistiť, že 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazoly vykazujú v porovnaní s INH podobnú antimykobakteriálnu aktivitu voči *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 a *M. avium* CNCTC My 330/88, a výrazne vyššiu aktivitu voči *M. kansasii* CNCTC My 235/80. Reverzný analóg 5-((3,4-dichlorbenzyl)sulfanyl)-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazol (**22**) vykazoval nižšiu aktivitu voči *M. tuberculosis* než INH, ale voči *M. kansasii* CNCTC My 235/80 vykazoval aktivitu výrazne vyššiu.

Porovnaním aktivít látok **13**, **16**, **19** (3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazoly) a reverzného analógu **22** možno povedať, že reverzný analóg vykazuje nižšiu účinnosť voči *M. tuberculosis*.

Ďalším porovnaním aktivity 1,2,4-oxadiazolov (**16,22**) s pôvodnými vysoko účinnými derivátmi 1,3,4-oxadiazolov (**4**) bolo zistené, že bioizostérnou zámienou 1,3,4-oxadiazolu za 1,2,4-oxadiazol došlo k výraznému poklesu antimykobakteriálnej aktivity ako u priamych tak aj u reverzných analógov (tabuľka 6). Z toho vyplýva, že aj tak malá zmena štruktúry – zmena usporiadania heteroatómu v heterocykle – môže mať silný vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu.



**Tabuľka 6. Porovnanie aktivity vybraných rovnako substituovaných zlúčenín 1,2,4-oxadiazolov a 1,3,4-oxadiazolov**

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 dní		7 / 14 / 21 dní	
<b>A</b>	0,06	16	0,5	0,5
<b>16</b>	0,5	250	0,5	-
<b>B</b>	0,03	16	0,03	0,03
<b>22</b>	2	125	4	4
<b>INH</b>	<b>0,5 / 1</b>	<b>&gt;250</b>	<b>&gt;250</b>	<b>4 / 4 / 4</b>

**A** = 5-fenyl-2-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,3,4-oxadiazol

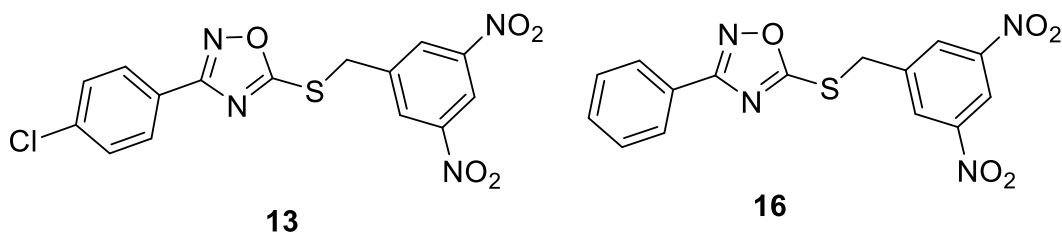
**B** = 2-((3,4-dichlorbenzyl)sulfanyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol

## 8.2. Testovanie cytotoxicity *in vitro*

Aby sme dostali základnú predstavu o toxicite látok, hodnotí sa ich cytotoxicita k líniam cicavčích buniek. Jednotkou porovnania je IC<sub>50</sub>, čo je polovičná hodnota maximálnej inhibičnej koncentrácie, pri ktorej dôjde k redukcii viability buniek na 50%. Boli vybrané dve pripravené látky, u ktorých sa hodnotil vplyv na životaschopnosť bunkových línií:

- CHO-K1 (ovariálne bunky čínskeho škrečka) po 24 hodinovej inkubácii
- COS-1 (obličkové fibroblasty mačička grivet) po 48 hodinovej inkubácii
- HepG2 (hepatocyty ľudského kaukazského karcinómu) po 48 hodinovej inkubácii

**Tabuľka 7. Vplyv vybraných zlúčenín na životaschopnosť cicavčích buniek**



	Bunky CHO-K1		Bunky COS-1		Bunky HepG2	
	IC <sub>50</sub> (μmol/l)	Viabilita pri 50 μM	IC <sub>50</sub> (μmol/l)	Viabilita pri 50 μM	IC <sub>50</sub> (μmol/l)	Viabilita pri 50 μM
<b>13</b>	> 100 <sup>i</sup>	/	> 50	98 ± 9 %	> 50	92 ± 9 %
<b>16</b>	> 100 <sup>i</sup>	/	> 50	105 ± 14 %	> 50	111 ± 16 %

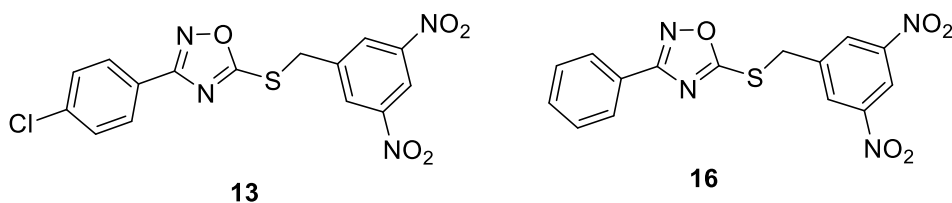
<sup>i</sup> Hodnota predstavuje najvyššiu koncentráciu testovanej látky, ktorá nespôsobila vyzrážanie  
behom inkubácie s bunkami

Z výsledkov hodnotenia cytotoxicity (tabuľka 7) môžeme zistiť, že vybrané zlúčeniny (**13,16**) majú relatívne malý negatívny vplyv na životaschopnosť cicavčích buniek po 24-hodinovej a 48-hodinovej inkubácii pri koncentrácii 50 μM.

### 8.3. Testovanie antimykotickej a antibakteriálnej aktivity *in vitro*

Selektivita antimykabteriálneho účinku bola hodnotená u dvoch vybraných zlúčenín voči 8 bakteriálnym kmeňom (4 grampozitívne koky a 4 gramnegatívne tyčky) a 8 hubovým kmeňom (5 kvasinkových a 3 plesňové). Pre hodnotenie týchto aktivít bola použitá metóda mikroriedenia v bujóne. Metóda bola vykonaná podľa pravidiel CLSI/EUCAST (Inštitút pre klinické a laboratórne štandardy/Európska komisia pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti) s malými obmenami. Jednotkou hodnotenia je minimálna inhibičná koncentrácia MIC vyjadrená v μmol/l.

**Tabuľka 8. In vitro antibakteriálna a antimykotická aktivita vybraných látok vyjadrená ako MIC ( $\mu\text{mol/l}$ )**



	8 bakteriálnych kmeňov		8 hubových kmeňov	
	(kmene 4 G+ kokov a 4 G- tyčiek)		(kmene 5 kvasiniek a 3 plesní)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>13</b>	> 500	> 500	> 500	> 500
<b>16</b>	> 500	> 500	> 500	> 500

Z hodnôt uvedených v tabuľke (tabuľka 8) je možné zistiť, že vybrané látky (**13,16**) nevykazujú takmer žiadnu antimykotickú či antibakteriálnu aktivitu voči testovaným bakteriálnym a hubovým kmeňom, čím sa potvrdzuje selektivita antimykobakteriálneho účinku testovaných látok.

## 9. Záver

V tejto práci bolo naviazané na predchádzajúcu prácu vykonanú na katedre organickej a bioorganickej chémie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej, kde bolo zistené, že deriváty 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolov a 2,5-disubstituovaných 1,3,4-oxadiazolov, ktoré obsahujú 3,5-dinitrobenzylsulfanylovú alebo 3,5-dinitrofenylovú skupinu, vykazujú značne vysokú antimykobakteriálnu aktivitu. Cieľom práce bola syntéza série látok s bioizostérnou zámenou 1,3,4-oxadiazolu za 1,2,4-oxadiazol a bolo tak pripravených 5 cieľových derivátov 1,2,4-oxadiazolu, obsahujúcich buď 3,5-dinitrofenylovú skupinu priamo naviazanú na heterocyklus v polohe 3 (reverzné analógy) alebo 3,5-dinitrobenzylsulfanylový reťazec v polohe 5 heterocyklu.

Najprv boli pripravené tri finálne látky typu priamych analógov 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu (**13,16,19**). U všetkých bola testovaná *in vitro* antimykobakteriálna aktivita. Bolo zistené, že tieto látky vykazujú antituberlukotickú aktivitu zrovnateľnú s INH, avšak majú výrazne nižšiu aktivitu než rovnako substituované látky 1,3,4-oxadiazolu (**4**). U dvoch látok bola tiež hodnotená *in vitro* cytotoxicita a antimykotická a antibakteriálna aktivita. Obe látky mali zanedbateľný vplyv na životaschopnosť cicavčích buniek a nevykazovali výraznú antimykotickú ani antibakteriálnu aktivitu, čo potvrdilo ich selektívny antimykobakteriálny účinok.

Ďalej boli pripravené dve látky typu reverzných analógov 5-arylsulfanyl-3-(3,5-dinitrofenyl)-1,2,4-oxadiazolu (**22,23**). U látky **22** bola hodnotená *in vitro* antimykobakteriálna aktivita a bolo zistené, že vykazuje aktivitu o niečo nižšiu než 3,5-disubstituované 1,2,4-oxadiazoly **13, 16, 19** a výrazne nižšiu aktivitu než rovnako substituované reverzné analógy 1,3,4-oxadiazolob (**7**).

Bolo teda zistené, že bioizostérna záměna 1,3,4-oxadiazolu za 1,2,4-oxadiazol viedla k výraznému poklesu *in vitro* antimykobakteriálnej aktivity a to ako v prípade typu priamych analógov, tak i u reverzných derivátov.

## 10. Zoznam skratiek

TB	tuberkulóza
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia
HIV	vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti
MDR	multiliekovo rezistentná
INH	isoniazid
RIF	rifampicin
XDR	extenzívne rezistentná
TDR	totálne liekovo rezistentná
DST	Test citlivosti na lieky
CDC	Centrum pre kontrolu a prevenciu nemocí
TBNET	The Tuberculosis Network European Trials group
PZA	pyrazinamid
EMB	ethambutol
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	Americká správa potravín a liečiv
EMA	Európska agentúra pre lieky
ATP	adenozíntrifosfát
TDM	dimykolát trehalózy
TMM	trehalózomonomykolát
DprE1	dekaprenylfosforyl- $\beta$ -D-ribóza-2'-oxidáza
ADME	absorpcia, distribúcia, metabolizmus, exkrécia
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografia
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-én

ČNSTK	Česká národní sbírka typových kultur
DMSO	dimetylsulfoxid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
IC <sub>50</sub>	poloviční hodnota maximální inhibiční koncentrace

## 11. Zoznam tabuliek

Tabuľka 1. V súčasnej dobe používané antituberkulotiká prvej voľby. ....	17
Tabuľka 2. Skupiny antituberkulotík doporučené pre liečbu MDR-TB a XDR-TB. <sup>17</sup> ..	20
Tabuľka 3. Porovnanie aktivity 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolov a thiadiazolov s INH .....	32
Tabuľka 4. Porovnanie aktivít reverzných analógov 1,5-disubstituovaných tetrazolov a 3,5-dinitrofenyl-1,3,4-oxadiazolov s INH .....	34
Tabuľka 5. In vitro antimykobakteriálna aktivita vybraných pripravených zlúčenín.	63
Tabuľka 6. Porovnanie aktivity vybraných rovnako substituovaných zlúčenín 1,2,4-oxadiazolov a 1,3,4-oxadiazolov .....	65
Tabuľka 7. Vplyv vybraných zlúčenín na životaschopnosť cicavčích buniek .....	66
Tabuľka 8. In vitro antibakteriálna a antimykotická aktivita vybraných látok vyjadrená ako MIC ( $\mu\text{mol/l}$ ) .....	67



## 12. Zoznam obrázkov

Obrázok 1. Celosvetové údaje z dohľadu nad liekovou rezistenciou. <sup>6</sup> .....	15
Obrázok 2. Lokality TBNET v celoeurópskej sieti zapojené do štúdia tuberkulózy rezistentnej na lieky. <sup>7</sup> .....	16
Obrázok 3. Štruktúra Isoniazidu.....	17
Obrázok 4. Štruktúra Rifampicínu.....	18
Obrázok 5. Štruktúra Pyrazínamidu.....	19
Obrázok 6. Štruktúra Ethambutolu.....	19
Obrázok 7. Prehľad vyvíjaných antituberkulotík a fáz preklinického a klinického vývoja, v ktorých sa nachádzajú. <sup>18</sup> .....	23
Obrázok 8. Štruktúra bedaquilínu.....	23
Obrázok 9. Štruktúra Delamanidu.....	24
Obrázok 10. Štruktúra pretomanidu.....	25
Obrázok 11. Štruktúra delpazolidu a sutezolidu.....	25
Obrázok 12. Štruktúra antituberkulotika SQ109.....	26
Obrázok 13. Štruktúra macozinónu.....	26
Obrázok 14. Štruktúra BTZ-043 (I. klinická fáza).....	27
Obrázok 15. Štruktúra Q203.....	27
Obrázok 16. In vitro antimykobakteriálna aktivita 2,4- a 3,5-dinitrobenzylsulfanylových derivátov benzazolu vyjadrená ako MIC ( $\mu\text{M}$ ).....	28
Obrázok 17. Základné štruktúry na katedre pripravených tetrazolov.....	29
Obrázok 18. Obecná štruktúra 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolov.....	31
Obrázok 19. Tautoméry 5-ST.....	31
Obrázok 20. Obecná štruktúra 2,5-disubstituovaných oxadiazolov (1) a thiadiazolov (2).....	32
Obrázok 21. Obecná štruktúra 1,5-disubstituovaných tetrazolov a 2,5-disubstituovaných oxadiazolov.....	33
Obrázok 22. Základná štruktúra pripravovaných látok.....	37
Obrázok 23. Obecný vzorec pripravovaných derivátov 3-aryl-5-((3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl)-1,2,4-oxadiazolu.....	37
Obrázok 24. Obecná štruktúra reverzných derivátov 3-(3,5-dinitrofenyl)-5-(benzylsulfanyl)-1,2,4-oxadiazolov.....	38

## 13. Použitá literatura, citace

---

- <sup>1</sup> World Health Organization, Tuberculosis fact sheet, Reviewed February 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
- <sup>2</sup> World Health Organization, Global tuberculosis report 2017. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
- <sup>3</sup> World Health Organization, Multidrug-resistant tuberculosis, Reviewed January 2018. <http://www.who.int/features/qa/79/en/>.
- <sup>4</sup> Velayati, A. A.; Farnia, P.; Masjedi, M. R. The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2013**, *6*(4), 307-309.
- <sup>5</sup> Global Health Education, Totally drug resistant TB, <https://www.tbfacts.org/totally-drug-resistant/>.
- <sup>6</sup> Günther, G.; Van Leth, F.; Alexandru, S.; Altet, N.; Avsar, K.; Bang, D.; Barbuta, R.; Bothamley, G.; Ciobanu, A.; Crudu, V.; Davilovits, M.; Dedicoat, M.; Duarte, R.; Gualano, G.; Kunst, H.; De Lange, W.; Leimane, V.; Magis-Escurra, C.; McLaughlin, A.-M.; Muylle, I.; Polcová, V.; Pontali, E.; Popa, C.; Rumetshofer, R.; Skrahina, A.; Solodovnikova, V.; Spinu, V.; Tiberi, S.; Viiklepp, P.; Lange, C. Multidrug-Resistant Tuberculosis in Europe, 2010-2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*(3), 409-416.
- <sup>7</sup> Leth, F. V.; Brinkmann, F.; Cirillo, D. M.; Dheda, K.; Duarte, R.; Guglielmetti, L.; Kuksa, L.; Lange, C.; Mitnick, C.; Skrahina, A.; Zaman, K.; Bothamley, G. The Tuberculosis Network European Trials group (Tbnet) ERS Clinical Research Collaboration: addressing drug-resistant tuberculosis through European cooperation. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*(1), 1802089.
- <sup>8</sup> Günther, G.; Van Leth, F.; Altet, N.; Dedicoat, M.; Duarte, R.; Gualano, G.; Kunst, H.; Muylle, I.; Spinu, V.; Tiberi, S.; Viiklepp, P.; Lange, C. Beyond multidrug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET study. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **2015**, *19*(12), 1524-1527.
- <sup>9</sup> World Health Organisation, Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, report 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf?sequence=1>.
- <sup>10</sup> Timmins, G.S.; Deretic, V. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* **2006**, *62*(5), 1220-1227.
- <sup>11</sup> World Health Organisation, Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care 2017 UPDATE. [https://www.who.int/tb/publications/2017/tb\\_guidelines2017\\_annex6\\_en\\_v4.pdf?ua=1](https://www.who.int/tb/publications/2017/tb_guidelines2017_annex6_en_v4.pdf?ua=1)
- <sup>12</sup> Wehrli, W. Rifampin: Mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Diseases* **1983**, *5*(3), 407-411.

- 
- <sup>13</sup> Semvua, H. H.; Kibiki, G. S.; Kisanga, E. R.; Boeree, M. J.; Burger, D. M.; Aarnoutse, R. Pharmacological interactions between rifampicin and antiretroviral drugs: challenges and research priorities for resource-limited settings. *Ther. Drug Monit.* **2015**, *37*(1), 22-32.
- <sup>14</sup> Zhang, Y.; Shi, W.; Zhang, W.; Mitchison, D. Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiol. Spectr.* **2013**, *2*(4), 1-12.
- <sup>15</sup> Takayama, K.; Kilburn, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1989**, *33*(9) 1493-1499.
- <sup>16</sup> Tiberi, S.; Munoz-Torrico, M.; Duarte, R.; Dalcolmo, M.; D'Ambrosio, L.; Migliori, G.-B. New drugs and perspectives for new anti-tuberculosis regimens. *Pulmonol.* **2018**, *24*(2), 86-98.
- <sup>17</sup> Chang, K.-C.; Nuermberger, E.; Sotgiu, G.; Leung, C.-C. New drugs and regimens for tuberculosis. *Respirology* **2018**, *23*(11), 978-990.
- <sup>18</sup> Sotgiu, G.; D'Ambrosio, L.; Centis, R.; Mura, I.; Castiglia, P.; Spanevello, A.; Migliori, G. B. The multidrug-resistant threat: old problems and new solutions. *J. Thorac. Dis.* **2015**, *7*(9), 354-360.
- <sup>19</sup> Cholo, M. C.; Mothiba, M. T.; Fourie, B.; Anderson, R. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2017**, *72*(2), 338-353.
- <sup>20</sup> Xavier, A. S.; Lakshmanan, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2014**, *5*(3), 222-224.
- <sup>21</sup> Stover, C. K.; Warren, P.; VanDevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, *405*, 962-966.
- <sup>22</sup> Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry 3rd, C. E. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science* **2008**, *322*, 1392-1395.
- <sup>23</sup> Wallis, R.S.; Dawson, R.; Friedrich, S.O.; Venter, A.; Paige, D.; Zhu, T.; Silvia, A.; Gobey, J.; Ellery, C.; Zhang, Y.; Eisenach, K.; Miller, P.; Diacon, A. H. Mycobactericidal Activity of Sutezolid (PNU-100480) in Sputum (EBA) and Blood (WBA) of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*(4), e94462.
- <sup>24</sup> Kaul, G.; Dasgupta, A.; Chopra, S. Delpazolid. Oxazolidinone antibiotic, Treatment of tuberculosis. *Drugs Fut.* **2018**, *43*(4), 233.
- <sup>25</sup> Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry III, C. E.; Boshoff, H. I. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2012**, *56*(4), 1797-1809.
- <sup>26</sup> Makarov, V.; Manina, G.; Mikusova, K.; Mollmann, U.; Ryabova, O.; Saint-Joanis, B.; Dhar, N.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; Lucarelli, A. P.; Milano, A.; De Rossi, E.; Belanova, M.; Bobovska, A.; Dianiskova, P.; Kordulakova, J.; Sala, C.; Fullam, E.; Schneider, P.; McKinney, J. D.; Brodin, P.; Christophe, T.; Waddell, S.; Butcher, P.; Albrethsen, J.; Rosenkrands, I.; Brosch, R.; Nandi, V.; Bharath, S.; Gaonkar, S.;

---

Shandil, R. K.; Balasubramanian, V.; Balganes, T.; Tyagi, S.; Grosset, J.; Riccardi, G.; Cole, S. T. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* **2009**, *324*, 801-804.

<sup>27</sup> Krutikov, M.; Bruchfeld, J.; Migliori, G. B.; Borisov, S.; Tiberi, S. New and repurposed drugs. *Tuberculosis* **2018**, *82*, 179-205.

<sup>28</sup> Pethe, K.; Bifani, P.; Jang, J.; Kang, S.; Park, S.; Ahn, S.; Jiricek, J.; Jung, J.; Jeon, H. K.; Cechetto, J.; Christophe, T.; Lee, H.; Kempf, M.; Jackson, M.; Lenaerts, A. J.; Pham, H.; Jones, V.; Seo, M. J.; Kim, Y. M.; Seo, M.; Seo, J. J.; Park, D.; Ko, Y.; Choi, I.; Kim, R.; Kim, S. Y.; Lim, S.; Yim, S.-A.; Nam, J.; Kang, H.; Kwon, H.; Oh, C.-T.; Cho, Y.; Jang, Y.; Kim, J.; Chua, A.; Tan, B. H.; Nanjundappa, M. B.; Rao, S. P. S.; Barnes, W. S.; Wintjens, R.; Walker, J. R.; Alonso, S.; Lee, S.; Kim, J.; Oh, S.; Oh, T.; Nehrbass, U.; Han, S.-J.; No, Z.; Lee, J.; Brodin, P.; Cho, S.-N.; Nam, K.; Kim, J. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1157–1160.

<sup>29</sup> Sone, N.; Nagata, K.; Kojima, H.; Tajima, J.; Kodera, Y.; Kanamaru, T.; Noguchi, S.; Sakamoto, J. A novel hydrophobic diheme c-type cytochrome. Purification from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the QcrCBA operon encoding three subunit proteins of a putative cytochrome reductase complex. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1503*, 279–290.

<sup>30</sup> Karabanovich, G.; Roh, J.; Smutný, T.; Němeček, J.; Vicherek, P.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Dufková, I.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *82*, 324-340.

<sup>31</sup> Karabanovich, G.; Roh, J.; Soukub, O.; Pávková, I.; Pasdiorová, M.; Tambor, V.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. Tetrazole regioisomers in the development of nitro group-containing antitubercular agents. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 174-181.

<sup>32</sup> Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362-2380.

<sup>33</sup> Karabanovich, G.; Němeček, J.; Valášková, L.; Carazo, A.; Konečná, K.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Pavliš, O.; Pávek, P.; Vávrová, K.; Roh, J.; Klimešová, V. S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *126*, 369-383.