

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



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**  
**SYNTÉZA A HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH ANTITUBERKULOTIK NA BÁZI**  
**NITROVANÝCH AROMÁTŮ**

**Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr. Václav Pflégr, Ph.D.**

**Hradec Králové 2024**

**Jakub Delong**

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl rád poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za vedení, poskytnutí zdrojů a rady během celé doby spolupráce. Rovněž bych chtěl poděkovat i RNDr. Václavu Pflégrovi, Ph.D., za vedení během provádění praktické části práce. Za otestování vzorků na antimykobakteriální aktivitu bych chtěl poděkovat RNDr. Jiřině Stolaříkové.

Práce byla podpořena z projektu Národní institut virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO55103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

### **Prohlášení**

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

V Hradci Králové dne 22.4.2024

.....

podpis

## Abstrakt

Tématem diplomové práce je příprava a následné hodnocení potenciálních antituberkulotik na bázi nitrovaných aromátů.

V teoretické části se práce zabývá tuberkulózou a její terapií, v dalších kapitolách rozebírá nitrované antimikrobiální látky již osvědčené, i nově připravované a testované. Praktická část zahrnuje vícekrokovou přípravu sloučenin ze substituované kyseliny benzoové, kyseliny pyrohroznové a různě substituovaných anilinů, které byly hodnoceny v inhibici růstu různých kmenů mykobakterií. Strukturní základ látek je *N*-fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid, který se liší substitucí na benzenovém jádře *N*-fenylpropanamidu. V případě čtyř sloučenin byla provedena obměna jedné nitroskupiny za trifluormethylovou skupinu.

Výtěžky syntéz finálních látek se pohybovaly v rozpětí 7-72 % a jejich hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) od 4 do více než 1000  $\mu\text{mol/l}$ . Jakožto nejúčinnější derivát se ukázal *N*-(4-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid.

### **Klíčová slova**

Antibiotika, antimykobakteriální aktivita, 3,5-dinitrobenzhydrazid, nitroskupina, syntéza, tuberkulóza

## Abstract

The goal of the master's thesis was the synthesis and assessment of potential molecules against tuberculosis based on aromatic compounds containing nitro groups.

The thesis reviews tuberculosis and its therapy, in the theoretical part, followed by well-known and new nitro group containing antibiotics. The experimental part reports multistep synthesis from parent compounds – substituted benzoic acid, pyruvic acid and variously substituted anilines, which were evaluated for their antimycobacterial activity. The core structure of the prepared compound molecules is *N*-phenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylidene]propanamide, which was variously substituted on the benzene ring of *N*-phenylpropanamide. In case of four compounds, one nitro group was switched to the trifluoromethyl group.

Yields varied from 7 to 72 % and their minimum inhibitory concentrations (MIC) ranged from 4 to more than 1000  $\mu\text{mol/l}$ . *N*-(4-Bromophenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylidene]propanamide proved to be the most effective derivative.

### Key words

Antibiotics, antimycobacterial activity, 3,5-dinitrobenzohydrazide, nitro group, synthesis, tuberculosis

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1.	Tuberkulóza .....	10
2.1.1.	Etiologie a patogeneze .....	10
2.1.2.	Klinický obraz.....	10
2.1.3.	Diagnostika .....	10
2.1.4.	Terapie.....	11
2.2.	Aktuálně užívaná antituberkulotika první linie .....	12
2.2.1.	Isoniazid .....	12
2.2.2.	Rifampicin .....	13
2.2.3.	Ethambutol .....	13
2.2.4.	Pyrazinamid .....	13
2.2.5.	Streptomycin .....	14
2.3.	Nitrované antimikrobiální látky.....	14
2.3.1.	Význam nitroskupiny v antimikrobiálních látkách .....	14
2.3.2.	Nitroimidazoly .....	16
2.3.3.	Nitrofurany a nitrothiofeny .....	22
2.3.4.	Nitrothiazoly .....	24
2.3.5.	1,3-Benzothiazin-4-ony.....	25
2.3.6.	Nitrofenylové deriváty.....	26
3	Cíl práce .....	30
4	Praktická část.....	31
4.1.	Syntéza prekurzorů.....	32
4.1.1.	Kyselina ( <i>E</i> )-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanová.....	32
4.2.2.	Kyselina ( <i>E</i> )-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanová.....	33
4.3.	Syntéza ( <i>E</i> )- <i>N</i> -fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidů .....	34
4.4.	Syntéza ( <i>E</i> )- <i>N</i> -fenyl-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidů .....	53
5	Biologické hodnocení .....	58
5.1.	Metodika [34] .....	58
6	Výsledky a diskuse .....	59
6.1.	Chemická část .....	59

6.2.	Biologická část .....	61
6.2.1.	Výsledky hodnocení aktivity proti <i>Mtb.</i> , <i>M. avium</i> a <i>M. kansasii</i> .....	61
6.2.2.	Diskuse – biologická část .....	61
7	Závěr .....	63
8	Seznam obrázků.....	64
9	Seznam tabulek .....	67
10	Seznam použité literatury .....	68

## Seznam zkratk

CT	Computed tomography, počítačová tomografie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Deuterovaný dimethylsulfoxid
DprE1	Dekaprenylfosforyl-beta-D-ribóza-2'-epimeráza 1
DprE2	Dekaprenylfosforyl-beta-D-ribóza-2'-epimeráza 2
EDAC.HCl hydrochlorid	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
INH	Isoniazid
LCR	Ligase chain reaction/ligázová řetězová reakce
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	Multi-drug resistant tuberculosis
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MF	Mobilní fáze
MR	Magnetická rezonance
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
PCR	Polymerase chain reaction/polymerázová řetězová reakce
TBC	Tuberkulóza



## 1 Úvod

Tuberkulóza (TBC) je nadále jeden z globálních zdravotních problémů i přes významný pokrok v její terapii. S rostoucí rezistencí k dostupným léčivým přípravkům se stává prakticky nezbytným vyhledávat nové a inovativní přístupy k terapii tohoto infekčního onemocnění. V této souvislosti má podstatnou roli výzkum nových molekul, mezi které můžeme zařadit i zde studované deriváty nitrovaných aromátů.

Nitrované sloučeniny se staly předmětem zájmu výzkumu léčiv díky svým fyzikálně-chemickým, biologickým a farmakologickým vlastnostem. Jejich schopnost pronikat do bakteriálních buněk a vykazovat antimykobakteriální účinky nabízí nadějně perspektivy v boji proti TBC. Tato vlastnost je umocněna schopností nitrovaných derivátů působit na metabolické dráhy mykobakterií, což může vést k potlačení růstu a přežití patogenu v hostiteli.

## 2 Teoretická část

### 2.1. Tuberkulóza

TBC je infekční onemocnění vyvolané nákazou obligátními patogeny ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex, mezi které se řadí například *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* či *Mycobacterium africanum*. [1]

#### 2.1.1. Etiologie a patogeneze

Přenos patogenu může proběhnout přes již nakaženou osobu, nejčastěji inhalační cestou ze sputa, které pacient vykašlává. Dále i přímým kontaktem s pacientovým sekretem, infikovanými předměty či přes zažívací trakt potravou z nakaženého hovězího dobytka, nejčastěji neošetřeným mlékem. Rozsah inkubační doby se pohybuje od 4 týdnů až do 2 let od expozice. Většina infikovaných pacientů (90 %) neonemocní ihned, avšak mohou, pokud se jejich imunitní systém oslabí. [1], [2]

#### 2.1.2. Klinický obraz

Hlavním orgánem, který tuberkulóza postihuje, jsou plíce. Nicméně může napadnout jakýkoliv orgán v těle. Latentní infekce se klinicky nijak neprojevuje. Pacienti nejsou infekční a jediný způsob potvrzení nákazy je přes imunologický test. [1], [3]

Na základě cesty infekce můžeme tuberkulózu rozdělit na formu plicní a mimoplicní. [1]

Plicní forma je typická postižením plicního parenchymu. Mezi příznaky řadíme zvýšenou únavu, noční pocení, hemoptýzu či produktivní kašel. U imunokompetentních dospělých dochází k pomalé progresi nemoci, na rozdíl od dětí či imunokompromitovaných pacientů [1], [3]

Mimoplicní forma může infikovat různé orgány, od lymfatických uzlin přes močové ústrojí až po centrální nervovou soustavu a mozkové pleny. Její příznaky se různí dle postiženého orgánu. Pokud mykobakterie napadne dva a více orgánů, hovoříme o diseminované formě. [1], [3]

#### 2.1.3. Diagnostika

Nejužitečnější zobrazovací vyšetřovací metodou je radiologické vyšetření ve formě skiagramu hrudníku. Obraz na rentgenu je u plicní formy typický a lze dle něj spolehlivě diagnostikovat TBC. U mimoplicní formy lze využít i CT (computed tomography, počítačová tomografie) či MR (magnetická rezonance) mozku, MR kostí, tkání orgánů v břišní dutině či ultrasonografie ledvin a uzlin, v závislosti na postižené oblasti. [1], [2]

Toto vyšetření lze podpořit mikroskopickým zhodnocením a kultivací mykobakterií z různých biologických materiálů pacienta (např. výpotku, sputa či jiné tělní tekutiny), které by měly být odebrány před zahájením terapie. Avšak kultivace je dlouhá, v řádech týdnů. Odečet obvykle probíhá po 3, 6 a 9 týdnech. [1], [2]

K novějším laboratorním metodám lze zařadit např. metodu založenou na detekci značeného  $^{14}\text{CO}_2$  uvolněného vlivem mykobakterií, PCR (polymerase chain reaction/polymerázová řetězová reakce), LCR (ligase chain reaction/ligázová řetězová reakce) či dokonce vyšetření na geny rezistence pro včasnou diagnostiku vysoce rezistentní *Mtb*. [2]

Rovněž lze využít i imunologické testy založené na uvolnění interferonu- $\gamma$  lymfocyty a dalšími buňkami, které byly v kontaktu s mykobakteriemi. Nelze však odlišit, zda má pacient aktivní či latentní formu, protože tímto testem prokážeme pouze setkání a nákazu pacienta patogenem. Dalším testem je i tuberkulinový kožní test, který obecně prokazuje přecitlivělost na mykobakterie, se kterými se již pacient setkal. Tento test může být poněkud zkomplikován proočkovanosťi populace vakcínou. Zároveň negativita tohoto testu nutně nevylučuje infekci TBC. [1], [2], [3]

#### 2.1.4. Terapie

Základními cíli léčby TBC je vyléčit pacienta, zachovat jeho kvalitu života, zabránit úmrtí, předejít pozdním komplikacím, zabránit šíření nemoci v populaci a vzniku rezistence na klinicky užívaná antituberkulotika. [4]

V rámci preventivní terapie se snažíme eliminovat mykobakterie v klidovém stavu a tím snížit pravděpodobnost reaktivace nemoci. [3]

Léčba TBC probíhá pod dohledem lékaře. Dle rozhodnutí pneumologa může být pacient hospitalizován a léčen pod přímým dohledem. Léčbu lze provádět i ambulantně za předpokladu, že se nejedná o komplikovaného pacienta, je schopen spolupracovat v domácí izolaci a neohrožuje zranitelné skupiny ve své domácnosti. [5]

Standardní režim léčby trvá 6 měsíců a je indikován u všech pacientů s nově diagnostikovanou TBC, HIV pozitivním pacientům a těhotným ženám. Tento režim zahrnuje čtyřkombinaci základních antituberkulotik v iniciální fázi (2 měsíce) s následným podáním dvojkombinace v pokračovací fázi (4 měsíce). V některých případech lze terapii protáhnout

až na 9 měsíců. Jedná o například o mimoplicní TBC, TBC u imunokompromitovaných pacientů či u nutnosti redukci počtu či dávek antituberkulotik. [5]

Mezi základní antituberkulotika řadíme isoniazid (INH), rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. Doplňkovým léčivem je streptomycin, který se využívá hlavně u rezistentní formy nemoci, recidiv či u formy TBC usídlené v centrální nervové soustavě. [4]

Velkým problémem v léčbě je existence rezistentních kmenů, zejména MDR-TB (multi-drug resistant tuberculosis). Jedná se o tuberkulózu rezistentní na INH a rifampicin s možnou rezistencí na další léčiva. [6] Terapie této formy obvykle trvá alespoň 2 roky a využívá speciální režimy léčby s využitím chinolonů, aminoglykosidů či makrolidů s následující úpravou dle citlivosti. [2] Tato léčiva shrnuje tabulka č. 1. Jednou z možností je podání pětikombinace skupiny A a B 6 měsíců. Následuje trojkombinace moxifloxacinu, cykloserinu a klofaziminu 14 měsíců. [4]

Léčiva užívaná v terapii MDR-TB dle WHO	
Skupina	Léčiva
Skupina A: Pokud možno, mají být použity všechny tři	Levofloxacin nebo moxifloxacin
	Bedachilin
	Linezolid
Skupina B: Pokud možno, přidat oba léky	Klofazimin
	Cykloserin nebo terizidon
Skupina C: Použít na doplnění léčebného režimu v případě, pokud nelze použít léky ze skupiny A a B.	Ethambutol
	Delamanid
	Pyrazinamid
	Imipenem-cilastatin nebo meropenem
	Amikacin nebo streptomycin
	Ethionamid nebo prothionamid
Kyselina <i>p</i> -aminosalicylová	

Tabulka 1 Léčiva na MDR-TB [4]

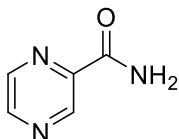
## 2.2. Aktuálně užívaná antituberkulotika první linie

### 2.2.1. Isoniazid

Isoniazid (struktura viz obrázek 1) zastavuje syntézu mykolových kyselin, které jsou důležitou součástí buněčné stěny. Díky tomuto mechanismu nemá vliv na lidské buňky. Jedná se o proléčivo, které se aktivuje mykobakteriálním enzymem KatG. Rezistence vůči němu může zvýšena hned několika způsoby, zejména mutací zmíněného KatG (znemožní se aktivace léčiva) či mutací operonu *gabG1-inhA* (klíčového enzymu v syntéze mykolových



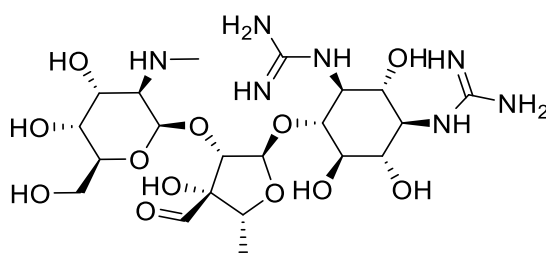
pyrazinkarboxylové) se váže na aspartátdekarboxylázu PanD, enzym zodpovědný za biosyntézu koenzymu A, který hraje roli v syntéze mastných kyselin. Zkřížená rezistence se zde nevyskytuje, avšak při monoterapii se rozvine poměrně rychle. [7], [11] Užívá se 1500 mg či 2000 mg denně v závislosti na hmotnosti, a to ve formě tablet. [9] Strukturu nalezneme na obrázku 4.



Obrázek 4 Vzorec pyrazinamidu

### 2.2.5. Streptomycin

Streptomycin (struktura viz obrázek 5) inhibuje syntézu bakteriálních proteinů přes vazbu na 30S podjednotku ribozomu a tvorby abnormálního páru kodon:antikodon. Jeho transport do buněk je závislý na kyslíku, tudíž působí pouze na aeroby. Působí baktericidně a jeho efekt může být posílen antibiotiky působícími na buněčnou stěnu. Rezistence se rozvíjí poměrně snadno několika mechanismy. Nejdůležitějším je inaktivace antituberkulotika mikrobiálními enzymy. [7] Podává se intravenózně od 10 mg/kg do 15 mg/kg v závislosti na věku. Po počáteční fázi se již ve všech věkových kategoriích užívá 15 mg/kg třikrát týdně. [9]



Obrázek 5 Vzorec streptomycinu

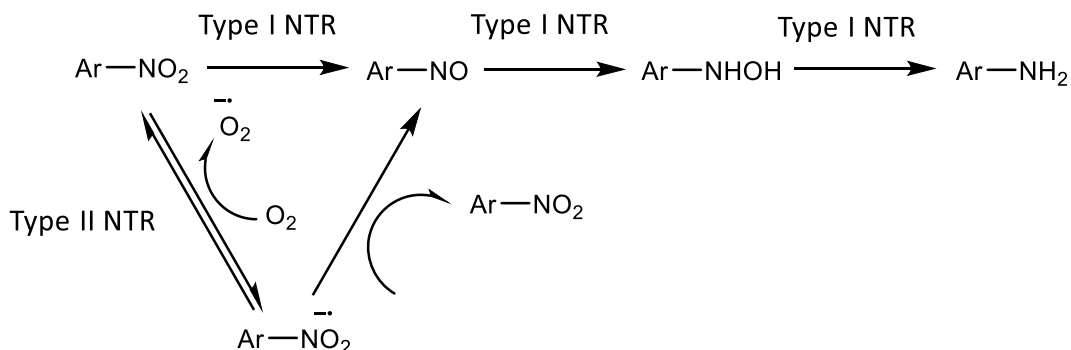
## 2.3. Nitrované antimikrobiální látky

### 2.3.1. Význam nitroskupiny v antimikrobních látkách

Nitroskupina díky svým fyzikálním a chemickým vlastnostem (záporný mezomerní i indukční efekt, polarita, velikost, schopnost tvořit vodíkové můstky) hraje podstatnou roli v protimikrobních látkách. [12]

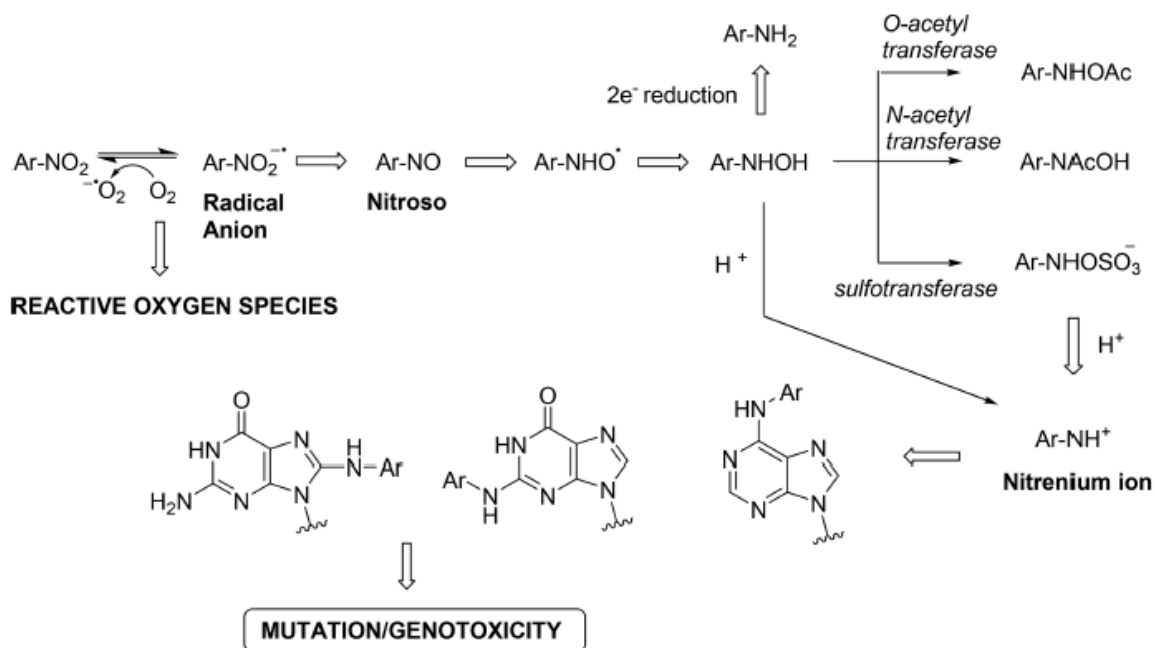
Jednou z nich jsou redoxní vlastnosti. Nitroskupina se může pomocí oxidoreduktáz (např. pyruvát/ferredoxin oxidoreduktáza) redukovat na různé formy znázorněné na obrázku 6.

Jakožto kofaktory využívají tyto enzymy flavinmononukleotid (FMN), flavinadenindinukleotid (FAD), nikotinamadenindinukleotid-fosfát (NADPH) či nikotinamidinukleotid (NADH). [12]



Obrázek 6 Obecný mechanismus redukce aromatických nitrosloúčenin [12]

Tímto způsobem mohou přímo působit či jako proléčiva po bioaktivaci na reaktivní formy dusíku, které teprve atakují patogeny. Účinkovat mohou i produkcí volných radikálů. Avšak tyto formy rovněž hrají roli v toxicitě nitrovaných antibiotik, jmenovitě vyšší hepatotoxicitě, genotoxicitě, mutagenitě (mechanismus působení viz obrázek 7) či kancerogenicitě. [12], [13]



Obrázek 7 Mutagenní působení nitroaromátů [14]

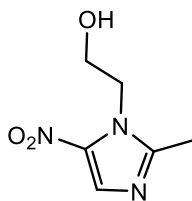
### 2.3.2. Nitroimidazoly

Nitroimidazoly jsou sloučeniny s velmi širokým spektrem účinku proti parazitům, mykobakteriím a anaerobním mikroorganismům. Strukturálně se jedná o imidazoly s připojenou nitroskupinou v poloze 2, 4 či 5. [15]

#### 2.3.2.1. 5-nitroimidazoly

Můžeme zde zařadit hned několik látek, jmenovitě tinidazol, ornidazol či seknidazol. Ovšem neznámější zástupce je bezesporu metronidazol (struktura viz obrázek 8). [12]

Používá se již od 50. let minulého století na léčbu anaerobních bakteriálních a parazitických infekcí (trichomoniázy, amébiázy, giardiózy...), na přidružené infekce u Crohnovy choroby a rosaceu. Rovněž je účinný na latentní/anaerobně rostoucí mykobakterie. Kromě širokého spektra má rovněž i přijatelné nežádoucí účinky. Působí jako proléčivo. Mechanismus účinku je založen na vstupu do buňky, následné tvorby redukované formy (vzniká acetamid a hydroxyethyloxamová kyselina) ve které se váže na DNA, čímž inhibuje syntézu nukleových kyselin, a tím vede ke konečné inaktivaci patogenu. [12], [15]

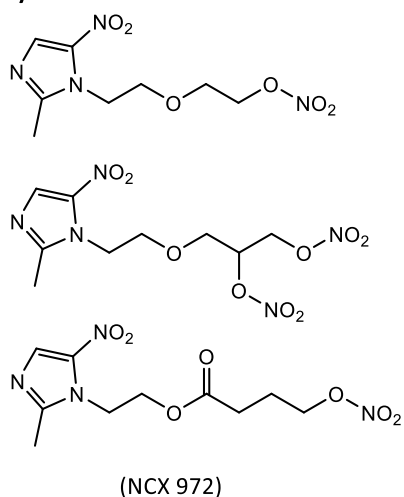


Obrázek 8 Struktura metronidazolu [15]

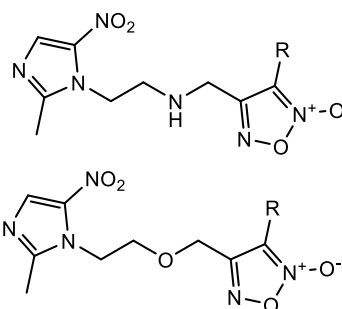
Kromě samotného metronidazolu byly i vyvinuty jeho hybridy – donory oxidu dusnatého (jejich struktury viz obrázek 9). Rozlišujeme zde tři skupiny, nitrooxy, furoxanové a furazanové deriváty. Byly nasyntetizovány za účelem eradikace *Helicobacter pylori* v terapii žaludečních vředů a dalších gastrointestinálních potíží. Tyto látky projevily v *in vitro* testování lepší výsledky v aktivitě proti *H. pylori* než samotný metronidazol, což je jedno z léčiv první volby. [12]



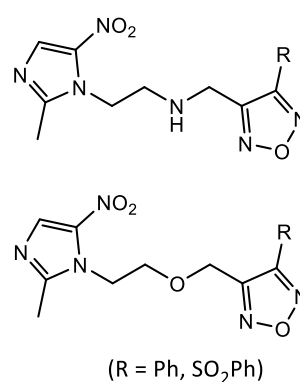
**Metronidazol hybridy - estery s kyselinou dusitou**



**Metronidazol-furoxan hybridy**

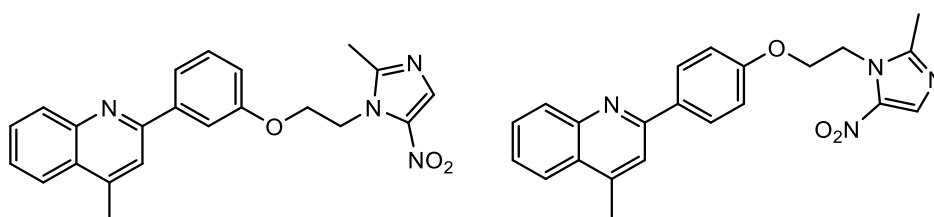


**Metronidazol-furazan hybridy**



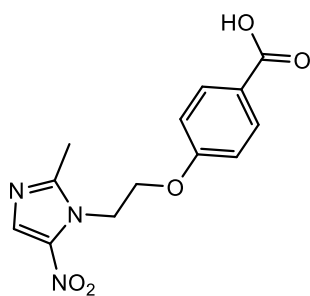
Obrázek 9 Metronidazolové hybridy - NO donory [12]

Proti viscerální leishamínóze byly nasynthetizovány hybridy metronidazolu a chinolinu, kde již samotné látky před hybridizací měly jistou aktivitu proti těmto patogenům. Jejich struktury jsou znázorněny na obrázku 10. [12]



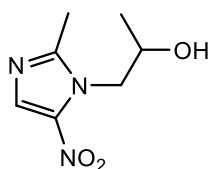
Obrázek 10 Metronidazol-chinolinové hybridy [12]

Proti trichomoniáze byly zhodnoceny hybridy metronidazolu s kyselinou *para*-hydroxybenzoovou. Jeden ze série, 4-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethoxy]benzoová kyselina, vykázal 1,8× vyšší efekt oproti metronidazolu (struktura viz obrázek 11). [15]



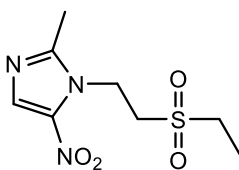
Obrázek 11 Struktura 4-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethoxy]benzoové kyseliny [15]

Do druhé generace nitroimidazolů spadá seknidazol (struktura viz obrázek 12). Oproti metronidazolu má delší biologický poločas a vyšší vstřebání *per os*. Působí selektivně na anaerobní bakterie a protozoa. Mechanismus účinku je podobný metronidazolu, spočívající v tvorbě reaktivních radikálů, které interferují se syntézou DNA. [15]



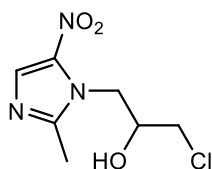
Obrázek 12 Struktura seknidazolu [15]

Tinidazol (struktura viz obrázek 13), další z nitroimidazolů, je antiprotozoální proléčivo užívané k terapii trichomoniázy, amebiázy, bakteriální vaginózy, negonokokové uretritidy a jiných sexuálně přenosných nemocí. Jeho mechanismus účinku je neznámý, ale předpokládá se, že je podobný výše zmíněným nitroimidazolům. [15]



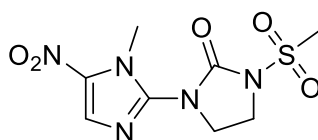
Obrázek 13 Struktura tinidazolu [15]

Ornidazol (struktura viz obrázek 14) má poměrně široké spektrum účinku, od žaludečních, střevních infekcí až po ty močové či pohlavní. Lze ho využít i preventivně na infekce při operačních zákrocích. Molekula ornidazolu prochází pasivním transportem do buňky, kde se pomocí ferredoxin-redoxního systému redukuje na aktivní amino formu. [15]



Obrázek 14 Struktura ornidazolu [15]

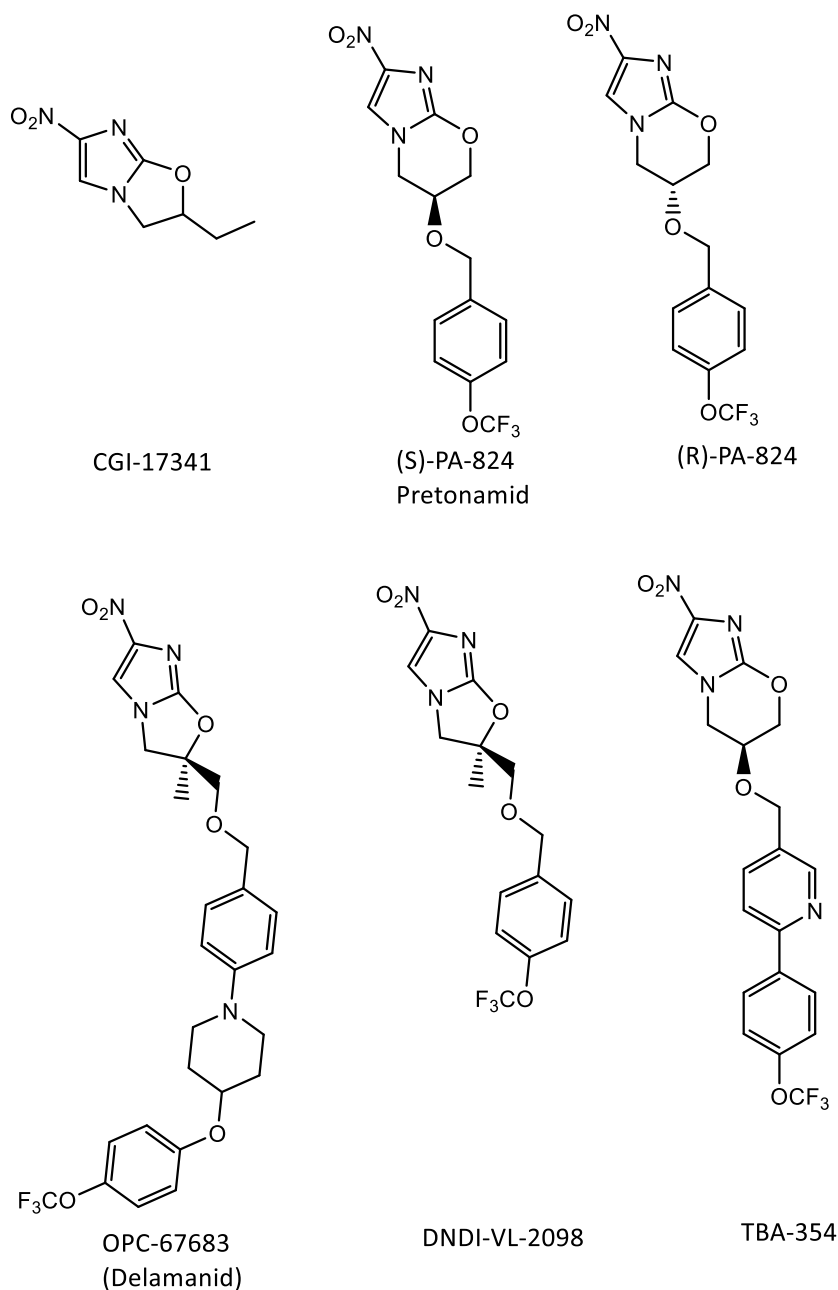
Mezi novější látky této skupině se řadí satranidazol (struktura viz obrázek 15), sulfonamidový nitroimidazol s vazbou C-N na C2. Funguje na jaterní abscesy způsobené amébami, trichomoniázu a giardiózu. Pro svůj účinek musí projít do buňky pasivní difuzí a následně bakteriálním redoxním systémem se redukuje na cytotoxickou formu. V této formě atakuje DNA a další důležité biomolekuly. [15]



Obrázek 15 Struktura satranidazolu [15]

#### 2.3.2.2. 4-nitroimidazoly

Jedná se o bicycklé sloučeniny obsahující imidazol a pěti- či šestičlenný kyslíkový kruh (struktury viz obrázek 16). Patří k nim například delamanid či pretomanid. Tyto látky prokázaly aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* a rovněž i proti anaerobním infekcím. Mechanismus účinku zahrnuje tvorbu  $\text{NO}_2^-$  a/nebo  $\text{NO}$ , které se účastní na biologické aktivitě. Z těchto látek byl schválen pretonamid (FDA, Food and Drug Administration) v kombinaci s bedachilinem a linezolidem a rovněž i delamanid (EMA, European Medicines Agency) k léčbě multilékově rezistentní TBC. [12], [16]



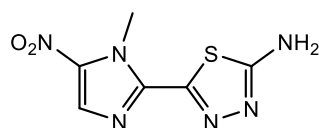
Obrázek 16 Struktury antimykobakteriálně aktivních 4-nitroimidazolů [12]

Jak bylo zmíněno výše, pretomanid (struktura viz obrázek 16) je antituberkulotikum působící také na rezistentní formy nemoci. Působí po aktivaci  $F_{420}$ -systémem (složen ze 2 enzymů – deazaflavin dependentní nitroreduktázy a  $F_{420}$  dependentní glukóza-6-fosfát dehydrogenázy a čtyř koenzymů) přítomným v mykobakterii. Mechanismus účinku spočívá v inhibici DprE2 (dekaprenylfosforyl-beta-D-ribóza-2'-epimeráza 2), klíčového enzymu v syntéze arabinogalaktanu, který je součástí buněčné stěny mykobakterie. [15], [17]

Další ze zástupců této strukturní skupiny je delamanid (struktura viz obrázek 16). Jedná se o nitro-dihydroimidazooxazol účinný také na rezistentní tuberkulózu. Stejně jako

pretomanid musí být delamanid aktivován v mykobakterii. Mechanismus účinku je shodný s pretomanidem, tedy přes inhibici DprE2. Kvůli zjištěné toxicitě pro embryo/plod je léčivo nevhodné k podávání těhotným ženám. [15], [16], [17]

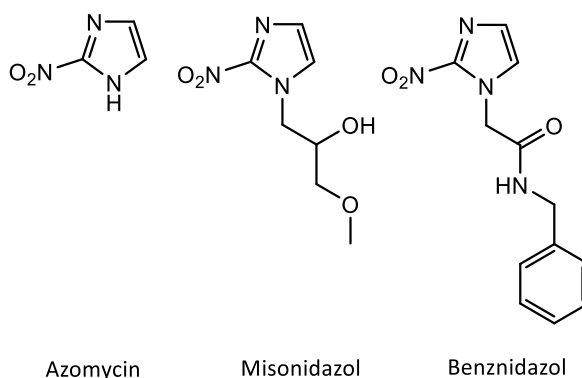
Megazol (struktura viz obrázek 17), hybrid 4-nitroimidazolu a 2-amino-1,3,4-thiadiazolu, byl vyvinut za účelem eradikace *Trypanosoma brucei* a *Trypanosoma cruzi*. Přesný mechanismus účinku není znám. Předpokládá se, že pasivní difuzí prochází do agens, kde po redukcí tvoří nitroradikály, zodpovědné za toxické působení na metabolismus. [18], [19]



Obrázek 17 Struktura megazolu [19]

### 2.3.2.3. 2-nitroimidazoly

Na rozdíl od metronidazolu tyto látky v těle neprodukují oxidy dusíku a všechny atomy dusíku a kyslíku zůstávají navázány na původní molekuly. Řadíme sem například azomycin, misonidazol či benznidazol. [12] Jejich struktury jsou znázorněny na obrázku 18.

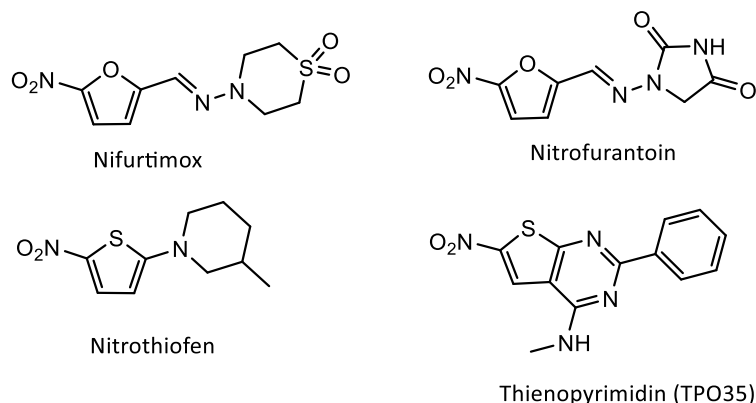


Obrázek 18 Struktury 2-nitroimidazolů [12]

Benznidazol je léčivo užívané na Chagasovu nemoc způsobenou *Trypanosoma cruzi*, jak na akutní, tak i chronickou formu. Analogicky jako předchozí látky, benznidazol působí až po redukcí na amino formu parazitickými nitroreduktázami. Posléze se váže na proteiny, lipidy či nukleové kyseliny, které následně poškozují. Je nevhodný pro těhotné ženy. V poslední době se na něj začíná tvořit rezistence. Mezi jeho nežádoucí účinky patří dermatitida či periferní neuropatie. [15], [20]

### 2.3.3. Nitrofurany a nitrothiofeny

Základem struktury je heterocyklus (furan či thiofen) substituovaný nitroskupinou. Tyto látky jsou již dlouho užívány v terapii anaerobních bakteriálních a parazitických infekcí. Působí přes uvolňování  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  po metabolizaci v játrech. [12], [15] Jejich struktury jsou znázorněny na obrázku 19.



Obrázek 19 Struktury některých nitrofuranů a nitrothiofenů [12]

#### 2.3.3.1. Nitrofurantoin

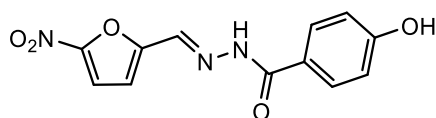
Nitrofurantoin, jakožto nejvýznamnější zástupce této strukturní skupiny, je antibiotikum užívané na prevenci a terapii močových infekcí (například infekce *E. coli*, *Enterobacter* či *Enterococcus*), zejména akutní cystitidy. Mechanismus účinku je komplexní a zahrnuje reaktivní produkty vzniklé bakteriální nitroreduktázou, které následně inhibují citrátový cyklus, syntézu DNA, RNA a proteinů. [12], [15] Z nežádoucích účinků se nejčastěji vyskytuje nauzea, zvracení, průjem či ztráta chuti. [21]

#### 2.3.3.2. Nifurtimox

Dalším zástupcem je nifurtimox, léčivo působící proti Chagasově nemoci a trypanozomě způsobující spavou nemoc. Jedná se o proléčivo, které se aktivuje v játrech pomocí cytochromu P450 a nitroreduktázy. V aktivní formě inhibuje trypanothion-reduktázu a tím ovlivňuje buněčnou ochranu proti oxidačnímu stresu. [12], [15], [22]

#### 2.3.3.3. Nifuroxazid

Širokospektré střevní antibiotikum užívané na akutní či chronické infekční průjmy, způsobené pozřením jídla či nápojů kontaminovaných patogeny jako *Giardia* nebo *Cryptosporidium*. Inhibuje proces buněčného dýchání a biosyntézu nukleových kyselin. Jeho výhodou je, že neovlivňuje intestinální flóru i při podání vysokých dávek. [15], [23] Jeho struktura je znázorněna na obrázku 20.



Obrázek 20 Vzorec nifuroxazidu [15]

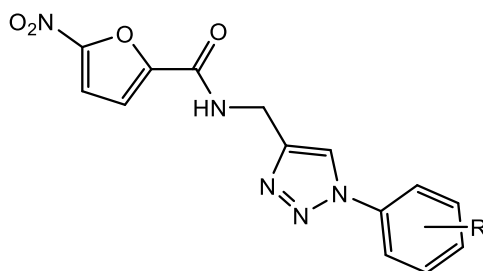
#### 2.3.3.4. Nitrothiofeny

Díky podobnosti thiofenu s furanem a imidazolem byly vytvořena a zhodnocena série látek se základem 5-nitrothiofenu a otestována na aktivitu proti mykobakteriím. Vzešla z toho aktivní a zároveň netoxická vůdčí struktura 2-(3-methylpiperidin-1-yl)-5-nitrothiofen. Studie ukazují, že pro mechanismus účinku je důležitá přítomnost F<sub>420</sub>-dependentní nitroreduktázy obsažena například v *Mycobacterium smegmatis*, jejíž vlivem se z molekuly uvolňuje NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. [12]

Zmíněný mechanismus byl studován na látce TPO53, což je kondenzovaný thiofen-pyrimidin aktivní vůči replikující i nereplikující formě mykobakterií. [12]

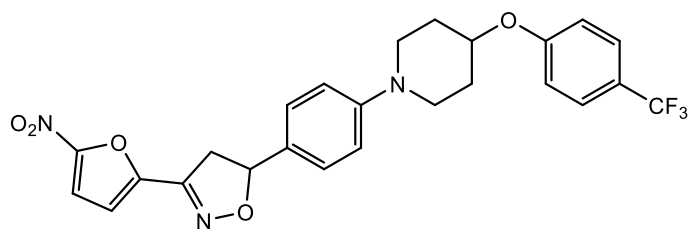
#### 2.3.3.5. Nové látky se strukturou nitrofuranů [15]

První sloučeniny kombinují nitrofuran a triazolový skelet (viz obrázek 21), který se již klinicky osvědčil. Byly testovány na aktivitu proti G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> a kvasince *Candida albicans*. Nejúčinnější se ukázala struktura se dvěma atomy chloru na fenylu, která měla zhruba 2× vyšší aktivitu než klinicky využívaný mikonazol proti *C. albicans* a *C. parapsilosis*.



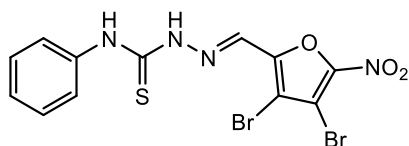
Obrázek 21 Struktura nitrofuran-triazolových hybridů [15]

Další výzkum byl zaměřen na pentacyklické deriváty nitrofuranu (struktura viz obrázek 22) s potenciální antituberkulotickou aktivitou. Vysoce aktivní vůči nereplikující se formě *Mycobacterium tuberculosis* se ukázal 3-(5-nitrofuran-2-yl)-5-{4-[4-(4-trifluormethylfenoxy)piperidin-1-yl]fenyl}-4,5-dihydroisoxazol.



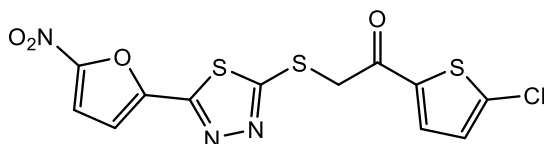
Obrázek 22 Struktura 3-(5-nitrofuran-2-yl)-5-[4-[4-(4-trifluoromethylphenoxy)piperidin-1-yl]fenyl]-4,5-dihydroisoxazolu [15]

Obečným trendem se ukázal být fakt, že aktivitu zvyšují elektron-odtahující skupiny. Z dalších derivátů se ukázal aktivní proti mykobakteriím 2-[(3,4-dibrom-5-nitrofuran-2-yl)methylen]-*N*-fenylhydrazin-1-karbothioamid (struktura viz obrázek 23). Oproti referenční látce, rifampicinu, byla aktivita vyšší až o 2 řády.



Obrázek 23 Struktura 2-[(3,4-dibrom-5-nitrofuran-2-yl)methylen]-*N*-fenylhydrazin-1-karbothioamidu [15]

Deriváty nitrofuran-thiadiazolu byly testovány na aktivitu proti leishmanióze. Dobré výsledky ukázal 1-(5-chlor-2-thienyl)-2-[[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]thio]ethan-1-on (struktura viz obrázek 24), a to proti *Leishmania major*, agens způsobující kožní leishmaniózu. Jeho  $IC_{50}$  byla zhruba 9× nižší oproti flukonazolu, referenčnímu léčivu.

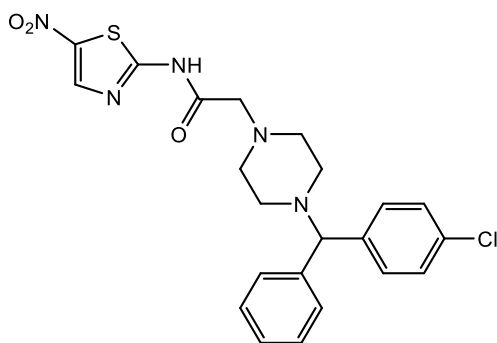


Obrázek 24 Struktura 1-(5-chlor-2-thienyl)-2-[[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]thio]ethan-1-onu [15]

#### 2.3.4. Nitrothiazoly

Byly syntetizovány a testovány deriváty 5-nitro-2-aminotiazolu proti různým kmenům rodu *Trypanosoma*. 2-{4-[(4-Chlorfenyl)(fenyl)methyl]piperazin-1-yl}-*N*-(5-nitrothiazol-2-yl)acetamid (struktura viz obrázek 25) vykázal okolo čtyřnásobku aktivity benznidazolu jako referenční látky. [15]

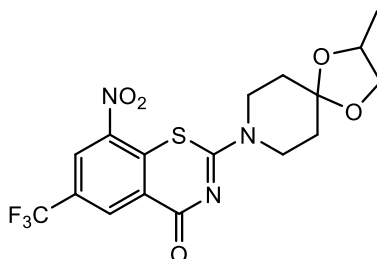




Obrázek 25 Struktura 2-[4-[(4-chlorofenyl)(fenyl)methyl]piperazin-1-yl]-N-(5-nitrothiazol-2-yl)acetamidu [15]

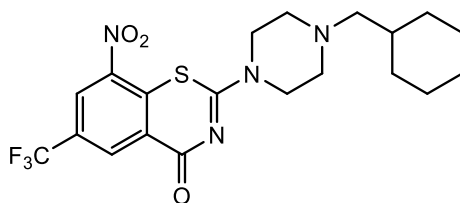
### 2.3.5. 1,3-Benzothiazin-4-ony

I tato skupina se ukázala aktivní proti tuberkulóze, a to zejména látka BTZ043. Pro účinek je důležitá přítomnost atomu síry a nitro skupiny, neboť redukce nitroskupiny na hydroxylamin/amin snižuje aktivitu. BTZ043 (struktura viz obrázek 26) ve formě proléčiva se redukcí aktivuje na nitrosoderivát, který se kovalentně váže na aktivní místo (thiolová skupina cysteinu 387) DprE1 (dekaprenylfosforyl-beta-D-ribóza-2'-epimeráza 1), enzymu hrající důležitou roli v tvorbě buněčné stěny. [12], [24]



Obrázek 26 Struktura BTZ043 [12]

Modifikací strukturního základu BTZ043 vznikl makozinon (obrázek 27) se stejným mechanismem účinku, avšak s nižší cenou výroby, jednodušší chemickou syntézou a lepším farmakodynamickým profilem. [25]



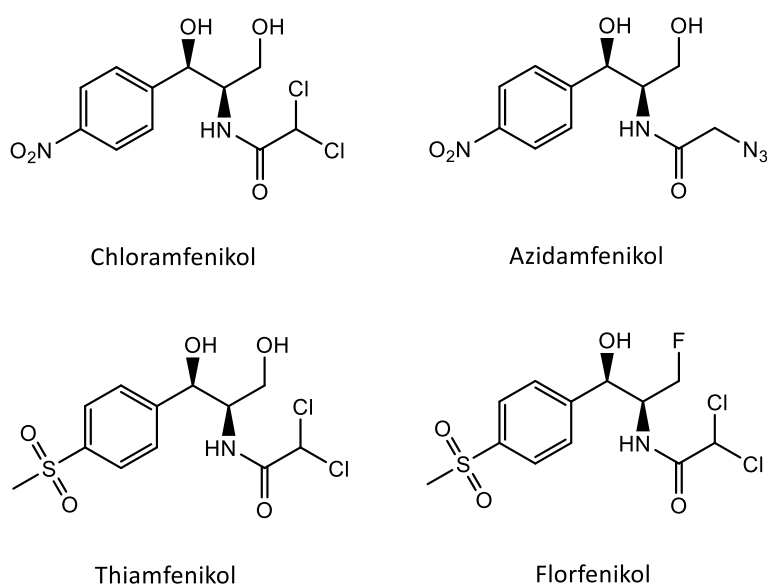
Obrázek 27 Struktura makozinonu [25]

### 2.3.6. Nitrofenylové deriváty

Několik látek z této skupiny jsou aktuálně užívány jakožto protinfekční látky. Strukturně obsahují nitro skupinu kovalentně vázanou na benzenový kruh. [15]

#### 2.3.6.1. Amfenikoly

Základní strukturou této skupiny je (1*R*,2*R*)-*N*-(1,3-dihydroxy-1-fenylpropan-2-yl)acetamid. [26] Jednotlivé látky se od sebe liší substitucí v poloze 4 benzenového jádra (nitro či methylsulfonylová skupina) či substitucí na acetamidovém skeletu (dichlor či azidová skupina). Jedna výjimka ze základního skeletu vznikla obměnou OH skupiny na C3 za fluor u florfenikolu. Zmíněné struktury jsou znázorněny na obrázku 28. [27]



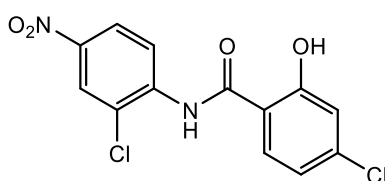
Obrázek 28 Struktury amfenikolů [26]

Jedná se o poměrně širokospektrá antibiotika působící proti G+ i G- mikroorganismům. [26] Vlivem přítomnosti nežádoucích účinků čítajíc např. aplastickou anémii, útlum kostní dřeně či „gray baby“ syndrom a poměrně rozšířené rezistenci, bylo jejich užívání značně omezeno. [15], [27] V klinické praxi se amfenikoly využívají buď ve formě topických přípravků (chloramfenikol v mastech či očních kapkách) [26], ve veterinární praxi (např. florfenikol v terapii respiračních infekcí dobytku a prasat) kvůli absenci zmíněných nežádoucích účinků u zvířat, či jako rezervní antibiotikum na těžké infekce (např. rezistentní *Haemophilus influenzae*, meningitida u pacientů, kterým nemohou být podány peniciliny, či na břišní tyfus). [7]

Mechanismus účinku je založen na reverzibilní vazbě na L16 protein 50S podjednotky bakteriálního ribozomu. Tímto způsobem se zastaví růst proteinů inhibicí tvorby peptidové vazby. [15]

#### 2.3.6.2. Niklosamid

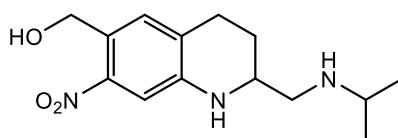
Jedná se o široce užívané anthelmintikum na léčbu tasemnicových infekcí či schistosomózy. Rovněž se u něj prokázala i protirakovinná aktivita v preklinických studiích. Mechanismus účinku je založen na procesu rozvratu vodíkového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně, inhibici syntézy ATP a aktivaci dýchacího řetězce pro oxidaci NADH. [15], [28] Jeho struktura je znázorněna na obrázku 29.



Obrázek 29 Struktura niklosamidu [15]

#### 2.3.6.3. Oxamnichin

Semisyntetické anthelmintikum s tetrahydrochinolinem (viz obrázek 30) jako základem struktury se užívá na léčbu infekce *Schistosomiasis mansoni* (i když je preferováno užití prazikvantelu). Jeho mechanismus působení není plně znám. Pravděpodobně se jedná o proléčivo. Po absorpci parazitem vzniká ester oxamnichinu s kyselinou sírovou pomocí endogenní sulfotransferázy. Tento ester se samovolně rozkládá, tím se mění na reaktivní elektrofil, který se váže na DNA, proteiny a další makromolekuly, což má za následek kontrakci a paralýzu parazita. Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou nauzea, zvracení, bolest hlavy či ospalost. Vzhledem k jeho vážnějším nežádoucím účinkům na centrální nervovou soustavu (halucinace, křeče) je indikován pouze při rezistenci na prazikvantel. [15], [29]

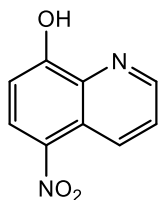


Obrázek 30 Struktura oxamnichinu [15]

#### 2.3.6.4. Nitroxolin

Hydroxychinolinové léčivo (struktura viz obrázek 31) účinné na močové infekce způsobené běžnými G+ a G- mikroorganismy (např. *E. coli*). Byla rovněž prokázána jeho účinnost proti

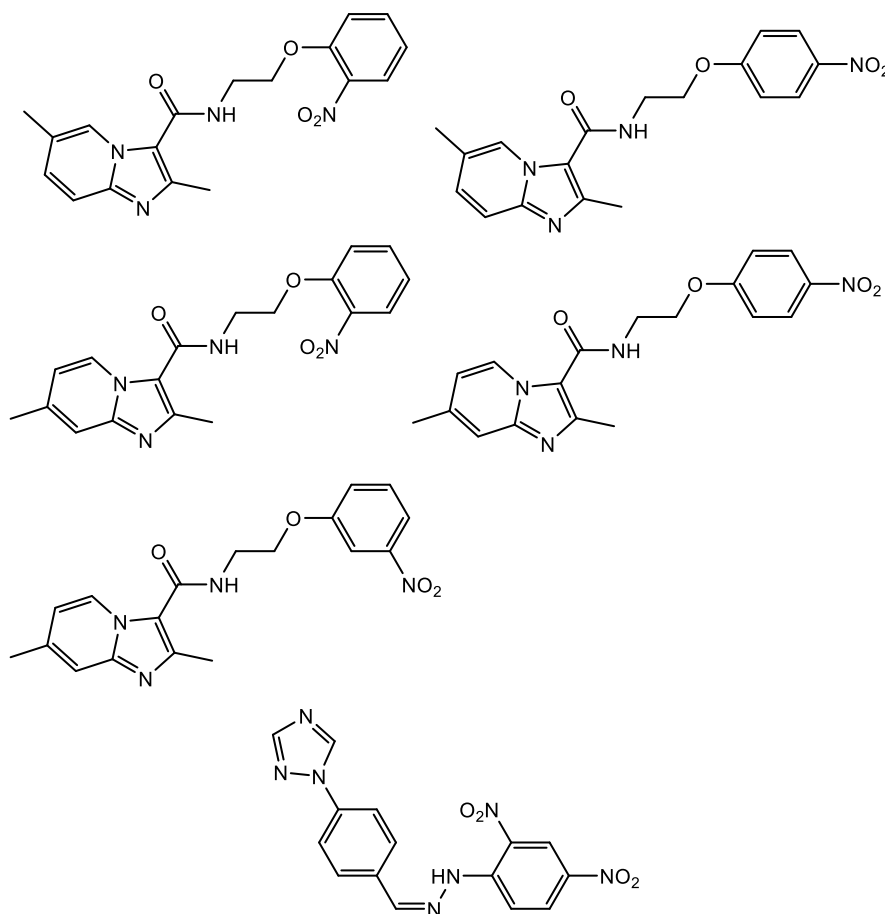
*Candida auris* či bakteriím způsobující průjem (např. *Clostridium difficile*, *Salmonella enteritidis* nebo *Yersinia enterocolitica*). Jeho bakteriostatický efekt je zapříčiněn chelatací kationtů potřebných pro funkci RNA polymerázy. [15], [30]



Obrázek 31 Struktura nitroxolinu [15]

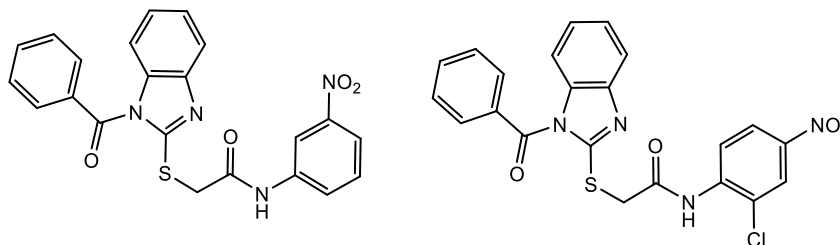
#### 2.3.6.5. *Nové látky se strukturou nitrobenzenu* [13]

Jedny z novějších látek vykazující antimykobakteriální aktivitu jsou deriváty *N*-(2-fenoxyethyl)imidazol[1,2-*a*]pyridin-3-karboxamidu (struktura viz obrázek 32). Prokázaly slibnou aktivitu proti kmeni H<sub>37</sub>Rv.



Obrázek 32 Struktury derivátů *N*-(2-fenoxyethyl)imidazol[1,2-*a*]pyridin-3-karboxamidu a 1-{4-[[2-(2,4-dinitrofenyl)hydrazon]methyl]fenyl}-1*H*-1,2,4-triazolu [13]

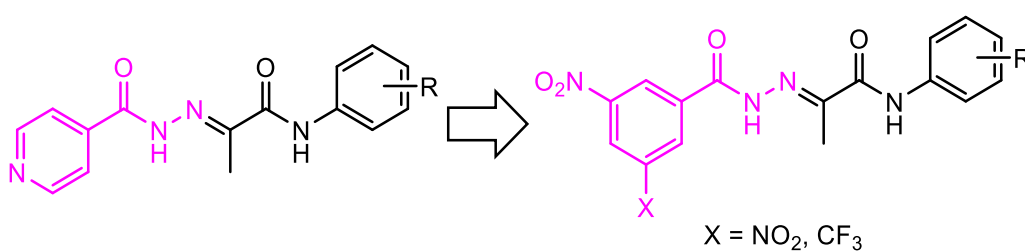
Proti stejnému kmeni rovněž prokázaly aktivitu deriváty 1-{4-[[2-(2,4-dinitrofenyl)hydrazon]methyl]fenyl}-1*H*-1,2,4-triazolu (struktura viz obrázek 32) či 2-(1-benzoyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-ylthio)-*N*-substituované amidy (struktura viz obrázek 33), které zároveň prokázaly efekt antifungální či antiproliferativní.



Obrázek 33 Struktury 2-(1-benzoyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-ylthio)-*N*-substituovaných amidů [13]

### 3 Cíl práce

Cílem práce je syntetizovat a zhodnotit biologickou aktivitu derivátů nitrovaných aromátů, konkrétně 2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-*N*-fenylpropanamidů substituovaných různými skupinami obsahující halogeny na *N*-fenylpropanamidové části. Rovněž se připraví jedna molekula substituovaná *n*-oktylem. Jde o analogii přechodí práce, kde byl místo 3,5-dinitrobenzohydrazidu použit k přípravě analogických sloučenin isoniazid. [31] Podle této práce byly voleny i substituenty na anilidové části cílových molekul. U sloučenin s nejvyšší aktivitou bude provedena záměna jedné nitro skupiny za trifluormethylovou. Jedná se o analogii s BTZ043. [24]



Obrázek 34 Schéma cíle diplomové práce

Připravené sloučeniny podstoupí *in vitro* testování biologické aktivity vůči mykobakteriím. Tyto hodnoty se porovnají s isoniazidem a nesubstituovanými hydrazidy.

## 4 Praktická část

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Merck (Darmstadt, Německo), VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění, pouze *n*-hexan byl purifikován destilací.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava dichlormethan/methanol v poměru 98:2 (v/v), detekce byla prováděna UV lampou (UV Lamp 4, Camag, Muttenz, Švýcarsko) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře v přístroji Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švýcarsko) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance; Ge krystal) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro  $^1\text{H}$  a 126 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JNM-ECZ 600R (600 MHz pro  $^1\text{H}$  a 151 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ; JEOL, Tokio, Japonsko). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid ( $\text{DMSO-}d_6$ ) a aceton (hodnoty chemického posunu  $\delta$  (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy nepřímo k tetramethylsilanu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla ( $\text{DMSO-}d_6$  při  $\delta = 39,5$  ppm,  $\text{aceton-}d_6$  při  $\delta = 29,8$  a 206,3 ppm). Interakční konstanta ( $J$ ) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické

chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Vypočtené i změřené hodnoty jsou udány v procentech.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 21.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). V tomto programu byly také vypočteny očekávané výsledky elementární analýzy.

Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

#### 4.1. Syntéza prekurzorů

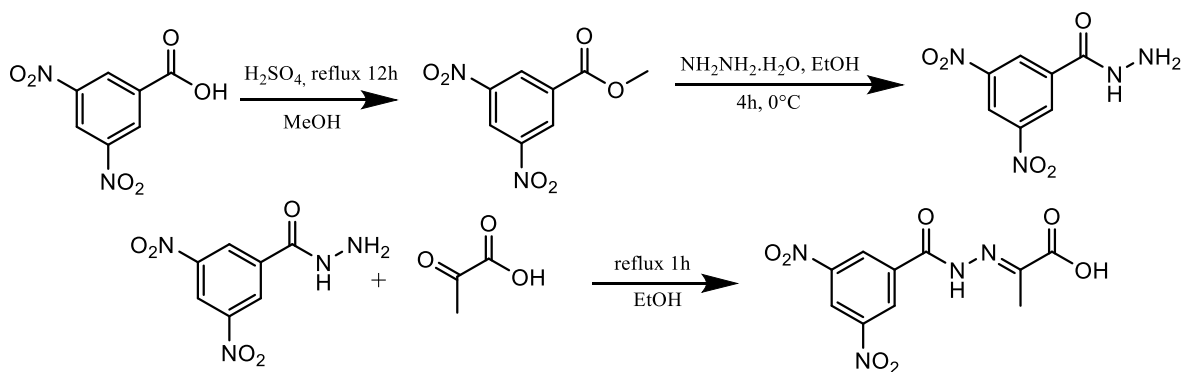
##### 4.1.1. Kyselina (*E*)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanová

3,5-Dinitrobenzoová kyselina (10,135 g, 47,78 mmol) byla rozpuštěna ve 100 ml methanolu. Po kapkách byla přidána koncentrovaná kyselina sírová (7 ml) a směs byla ponechána reagovat přes noc za varu pod zpětným chladičem. Methanol byl odpařen pomocí sníženého tlaku a zbytek byl rozpuštěn v ethyl-acetátu. Pomocí nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného se upravilo pH na hodnotu 7. Reakční směs se poté vytřepala solankou a organická část byla vysušena stáním nad bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát byl odpařen pomocí sníženého tlaku za zisku krystalického produktu. [32] Výtěžek byl 96 %.

Získaný methyl-3,5-dinitrobenzoát (10,47 g, 46,30 mmol) byl rozpuštěn ve 300 ml horkého ethanolu. Po kapkách byl přidán v nadbytku 64% roztok hydrazin hydrátu (7 ml) a směs se míchala 1 hodinu za laboratorní teploty. Posléze se směs ochladila externě ledem na 0 °C a byla nadále míchána 4 hodiny. Směs jsme přefiltrovali a izolované krystaly promyli postupně ethanolem a diethyletherem. [33] Výtěžek po vysušení byl 52 %.

3,5-Dinitrobenzohydrazid (5,38 g, 23,78 mmol) byl rozpuštěn ve 400ml horkého ethanolu. Posléze byl postupně přikapáván 1,1 ekvivalent (2,30 g, 1,86 ml) kyseliny pyrohroznové a směs se míchala za varu 1 hodinu pod zpětným chladičem. Sraženina byla odfiltrovaná a promyta studeným methanolem. [31] Výtěžek byl 61 %.





Obrázek 35 Schéma syntézy kyseliny (*E*)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylidene]propanové

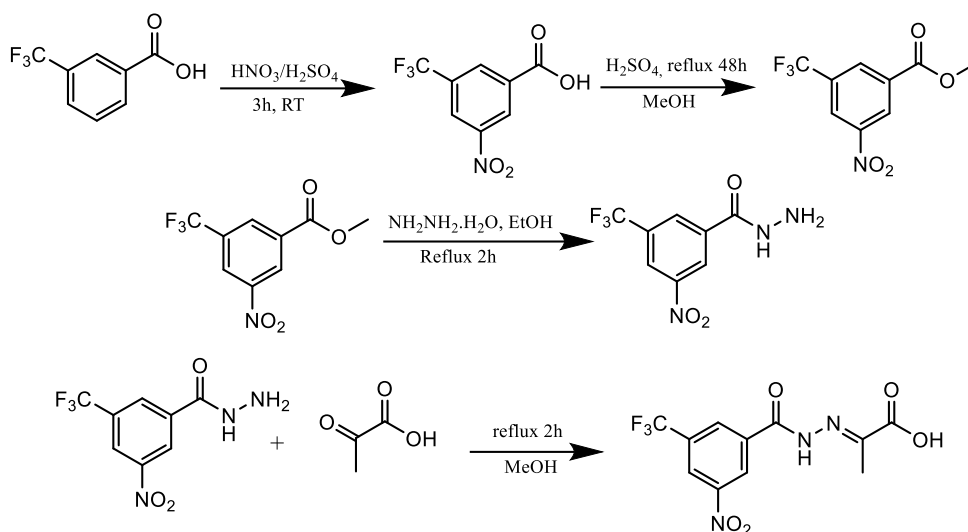
4.2.2. Kyselina (*E*)-2-[2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinylidene]propanová  
 Dýmavá kyselina dusičná (5,5 ml) se po kapkách za intenzivního míchání přidala ke směsi kyseliny 3-trifluormethylbenzoové (5 g, 26 mmol) a koncentrované kyseliny sírové (23 ml). Směs se míchala 3 hodiny při pokojové teplotě a poté se nalila na led. Precipitát byl hned odfiltrován, rozpuštěn ve 30 ml ethyl-acetátu a extrahován 2×25 ml vodou a 2×25 ml solankou. Organická vrstva se vysušila bezvodým síranem sodným a ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku. [33] Výtěžek je 76 %.

3-Nitro-5-(trifluormethyl)benzoová kyselina (4,728 g, 20,09 mmol) se rozpustila v 70 ml methanolu a přidalo se 15 kapek koncentrované kyseliny sírové. Směs se míchala pod zpětným chladičem za varu 48 hodin. Rozpouštědlo se odpařilo za sníženého tlaku a zbytek byl rozpuštěn v 60 ml ethyl-acetátu a promyt 2×40 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a 1×40 ml solanky. Vodné vrstvy byly poté ještě vytřepány s ethyl-acetátem. Organické frakce byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Následně byl ethyl-acetát odpařen za sníženého tlaku. [33] Výtěžek byl 87 %.

Hydrazin hydrát (8,686 ml, 87,12 mmol) se přidal do roztoku methyl-3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoátu (4,343 g, 17,43 mmol) v 80 ml ethanolu. Směs se 2 hodiny míchala za varu pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo se odpařilo za sníženého tlaku a zbytek se rozpustil v 80 ml chloroformu a extrahoval 3×40 ml vody a 1×20 ml solanky. Organická vrstva se vysušila bezvodým síranem sodným a odpařila za sníženého tlaku. [33] Výtěžek byl 89 %.

3-Nitro-5-(trifluormethyl)benzohydrazid (2,0 g, 8 mmol) byl rozpuštěn ve 60 ml horkého methanolu. Posléze byl postupně přikapáván 1,1 ekvivalent pyruvátu a směs se míchala 2 hodiny pod zpětným chladičem. Methanol se odpařil za sníženého tlaku a zbytek byl

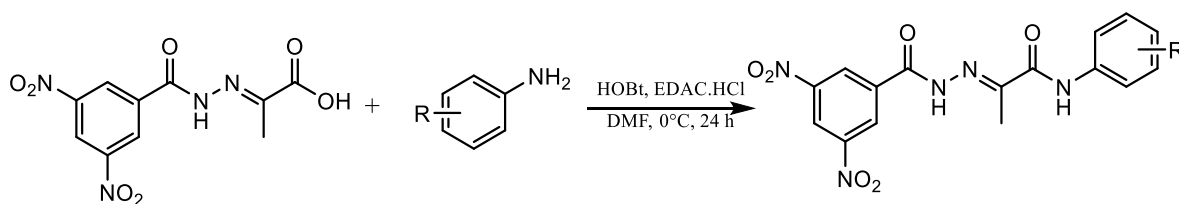
rozpuštěn v ethyl-acetátu a převrstven hexanem. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. [31] Výtěžek byl 89 %.



Obrázek 36 Schéma syntézy kyseliny (E)-2-[2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden]propanové

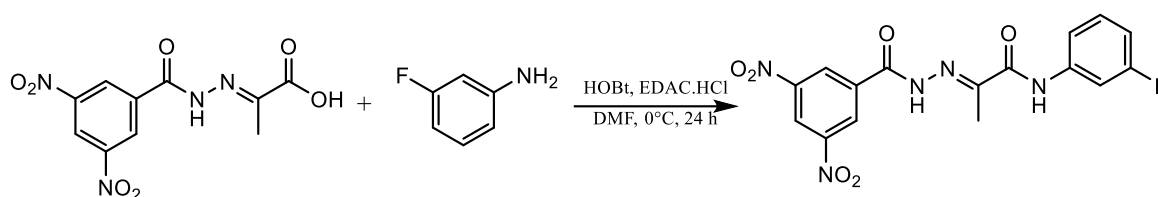
#### 4.3. Syntéza (E)-N-fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidů Obecný postup syntézy

2-[2-(3,5-Dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanová kyselina (296,2 mg, 1,0 mmol) a 1,1 ekvivalentu 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBt, 148 mg) bylo rozpuštěno v 20 ml DMF (*N,N*-dimethylformamid) za stálého míchání. Směs byla ochlazená ledovou lázní na 0 °C. Byl přidán odpovídající substituovaný anilin (1,1 mmol), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDAC.HCl, 2,6 mmol, 500 mg) a směs se ponechala míchat 24 hodin při 0°C. Rozpouštědlo se odpařilo do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustil v 15 ml ethyl-acetátu. Reakční směs byla převedena do dělicí nálevky a vytřepána postupně s 15 ml vody, 2×15 ml 10% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 2×15 ml solanky. Organická vrstva se oddělila a vysušila bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo se odpařilo do sucha pod sníženým tlakem. Pokud bylo potřeba, produkt se přečistil krystalizací z dichlormethanu nebo použitím kolonové chromatografie. [31] Jako mobilní fáze se použila směs dichlormethanu a methanolu v poměru 98:2 (v/v).



Obrázek 37 Schéma syntézy (E)-N-fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-fluorfenyl)propanamid (JD-M-F)**



Obrázek 38 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-fluorfenyl)propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	389,30
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	35 %
Teplota tání:	154,4 °C
R <sub>f</sub>	0,86

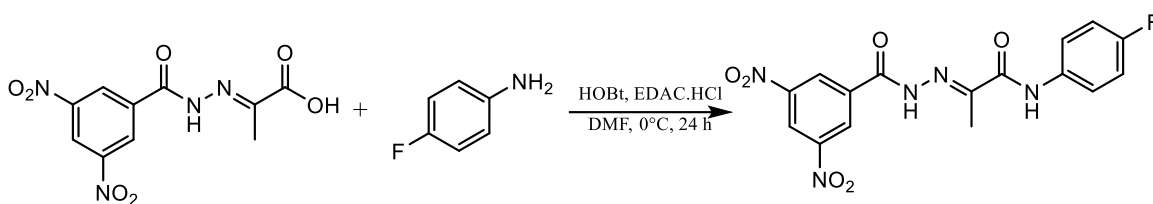
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.59 (s, 1H, CONHN), 10.26 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.72 – 7.68 (m, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.55 – 7.51 (m, 1H, H<sub>6</sub>'), 7.36 – 7.30 (m, 1H, H<sub>5</sub>'), 6.91 – 6.86 (m, 1H, H<sub>4</sub>'), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.53, 162.58 (d, *J* = 241.3 Hz), 152.45, 148.48, 148.30, 140.50 (d, *J* = 7.6 Hz), 136.51, 130.83 (d, *J* = 9.6 Hz), 129.18, 122.00, 116.51, 110.88 (d, *J* = 20.6 Hz), 107.38 (d, *J* = 20.7 Hz), 13.37.

IR: 3107, 1667, 1629, 1613, 1541, 1520, 1492, 1474, 1442, 1344, 1270, 1188, 1168, 1128, 1076, 966, 920, 869, 794, 760, 731, 717, 683, 644 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 49,36; H 3,11; N 17,99; nalezeno C 49,33; H 3,10; N 17,95.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]-N-(4-fluorfenyl)propanamid (JD-P-F)**



Obrázek 39 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]-N-(4-fluorfenyl)propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	389,30
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	18 %
Teplota tání:	112,9 °C
R <sub>f</sub>	0,86

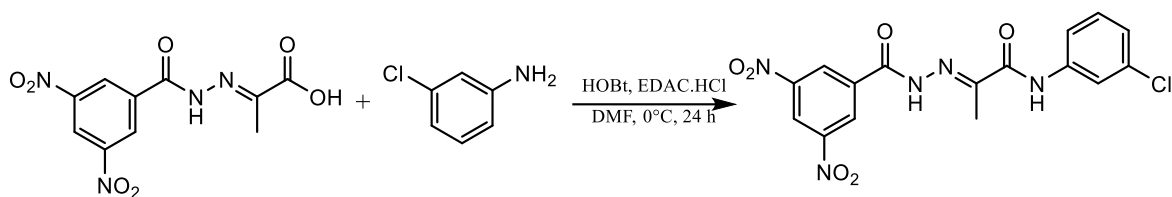
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.54 (s, 1H, CONHN), 10.12 (s, 1H, CONH), 9.03 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.97 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.77 – 7.69 (m, 2H, H<sub>2</sub>' , H<sub>6</sub>' ), 7.17 – 7.13 (m, 2H, H<sub>3</sub>' , H<sub>5</sub>' ), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.22, 158.92 (d, *J* = 241.0 Hz), 152.60, 148.49, 136.49, 135.10, 129.17, 126.49, 122.60, 122.03, 115.79 (d, *J* = 22.2 Hz), 13.43.

IR: 3226, 3101, 1689, 1674, 1627, 1531, 1508, 1343, 1327, 1293, 1269, 1208, 1173, 1153, 1116, 1073, 1025, 958, 836, 763, 740, 730, 714 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 49,36; H 3,11; N 17,99; nalezeno C 49,39; H 3,15; N 18,03.

**(E)-N-(3-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamid (JD-M-Cl)**



Obrázek 40 Schéma syntézy (E)-N-(3-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamidu

Sumární vzorec:

C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

Relativní molekulová hmotnost:

405,75

Popis:

Světle žlutá pevná látka

Výtěžek:

12 %

Teplota tání:

179,8 °C

R<sub>f</sub>

0,85

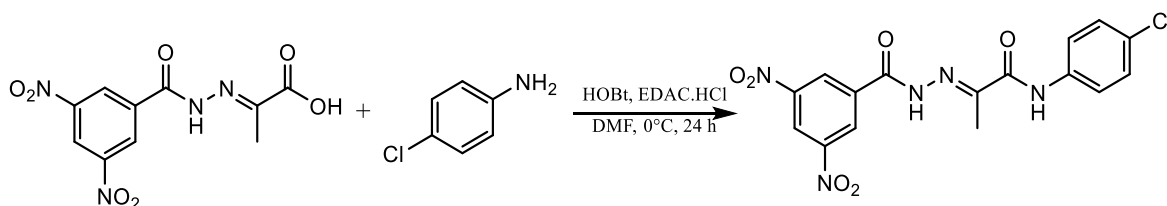
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 10.01 (s, 1H, CONH), 9.13–9.07 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), 8.03 (s, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.34–7.28 (m, 2H, H<sub>4</sub>', H<sub>5</sub>'), 7.10 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>'), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 162.18, 151.96, 148.58, 139.93, 136.86, 136.74, 133.91, 130.21, 128.45, 123.68, 121.42, 119.63, 118.24, 10.62.

IR: 3414, 3306, 3094, 1682, 1671, 1629, 1592, 1544, 1523, 1420, 1372, 1342, 1279, 1260, 1179, 1155, 1078, 921, 883, 794, 743, 729, 713, 684, 670, 653, 636, 624, 617, 608 cm<sup>-1</sup>.

EA: Vypočteno C 47,36; H 2,98; N 17,26; nalezeno C 47,32; H 3,01; N 17,30.

**(E)-N-(4-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamid (JD-P-Cl)**



Obrázek 41 Schéma syntézy (E)-N-(4-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	405,75
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	7 %
Teplota tání:	184,8 °C
R <sub>f</sub>	0,87

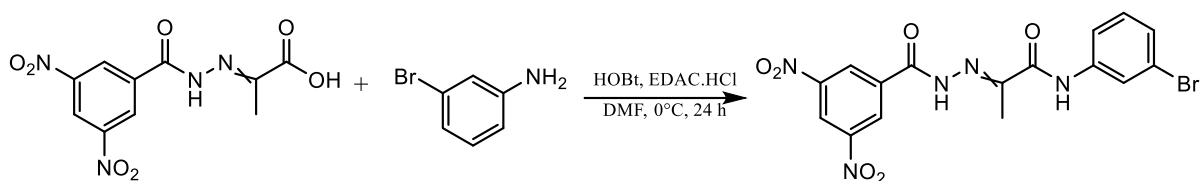
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 10.75 (s, 1H, CONHN), 9.95 (s, 1H, CONH), 9.11 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 9.09 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.87 – 7.83 (m, 2H, H<sub>2</sub>′, H<sub>6</sub>′), 7.34 – 7.29 (m, 2H, H<sub>3</sub>′, H<sub>5</sub>′), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 161.94, 161.14, 150.63, 148.58, 141.56, 137.43, 136.59, 130.05, 128.27, 121.42, 121.32, 13.66.

IR: 3100, 1681, 1627, 1591, 1541, 1517, 1492, 1343, 1310, 1284, 1265, 1171, 1079, 831, 743, 729, 719, 699, 686, 680, 671, 660, 654, 646, 640, 633, 627, 621, 616, 606 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 47,36; H 2,98; N 17,26; nalezeno C 47,35; H 2,94; N 17,23.

**(E)-N-(3-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (JD-M-Br)**



Obrázek 42 Schéma syntézy (E)-N-(3-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> BrN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	450,21
Popis	Nažloutlá pevná látka
Výtěžek:	21 %
Teplota tání	196,8 °C
R <sub>f</sub>	0,88

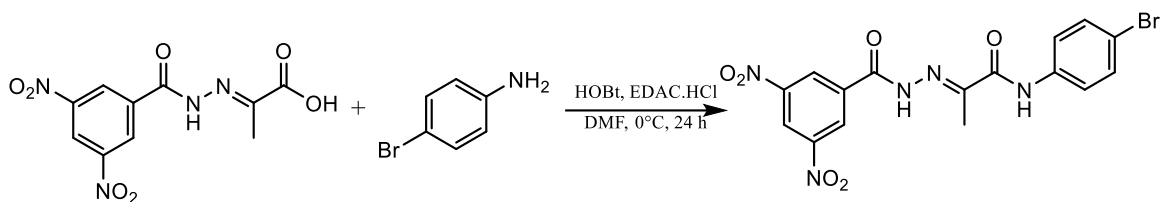
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.77 (s, 1H, CONHN), 10.26 (s, 1H, CONH), 9.04 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.97 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.07 (s, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.71 (s, 1H, H<sub>4</sub>'), 7.29 – 7.23 (m, 2H, H<sub>5</sub>', H<sub>6</sub>'), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.90, 154.72, 148.43, 147.21, 140.39, 137.25, 136.54, 131.18, 129.26, 127.00, 123.03, 121.96, 119.37, 13.46.

IR: 3130, 3091, 1682, 1670, 1645, 1629, 1591, 1544, 1521, 1451, 1425, 1342, 1279, 1261, 1178, 1117, 792, 756, 742, 729, 713, 684 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 42,69; H 2,69; N 15,56; nalezeno C 42,63; H 2,75; N 15,52.

**(E)-N-(4-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (JD-P-Br)**



Obrázek 43 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu

Sumární vzorec:  $C_{16}H_{12}BrN_5O_6$

Relativní molekulová hmotnost: 450,21

Popis: Světle žlutá pevná látka

Výtěžek: 30 %

Teplota tání: 251,7 °C

R<sub>f</sub>: 0,88

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  11.54 (s, 1H, CONHN), 10.18 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H2, H6), 8.98 (s, 1H, H4), 7.74 – 7.70 (m, 2H, H3', H5'), 7.51 – 7.46 (m, 2H, H2', H6'), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

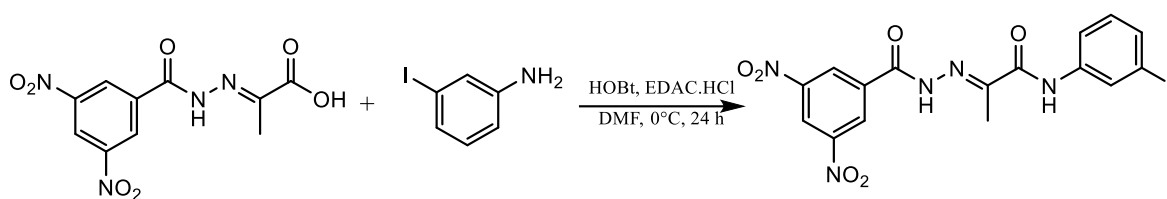
$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  163.48, 161.63, 152.73, 148.50, 138.14, 136.57, 132.03, 129.17, 122.70, 121.99, 116.15, 13.43.

IR: 3325, 3104, 2987, 1693, 1682, 1663, 1627, 1588, 1540, 1518, 1490, 1397, 1343, 1284, 1266, 1172, 1157, 1076, 916, 831, 743, 730, 717, 690  $cm^{-1}$ .

EA: vypočteno C 42,69; H 2,69; N 15,56; nalezeno C 42,75; H 2,65; N 15,52.



**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-jodfenyl)propanamid (JD-M-I)**



Obrázek 44 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-jodfenyl)propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> IN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	497,21
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	38 %
Teplota tání:	201,1 °C
R <sub>f</sub>	0,88

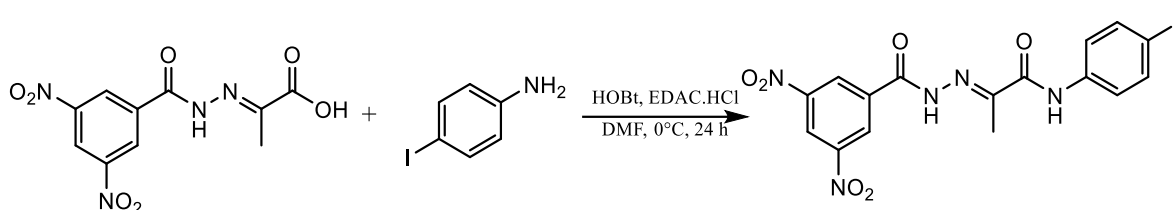
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.56 (s, 1H, CONHN), 10.16 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.22 (s, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.72 (s, 1H, H<sub>4</sub>'), 7.42 (s, 1H, H<sub>6</sub>'), 7.10 (s, 1H, H<sub>5</sub>'), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.51, 161.56, 152.34, 148.47, 140.14, 136.57, 132.94, 131.23, 129.19, 128.88, 122.01, 119.99, 94.95, 13.36.

IR: 3259, 3095, 1692, 1666, 1586, 1542, 1519, 1409, 1340, 1274, 1261, 1178, 1171, 1116, 798, 743, 728, 714, 683, 651, 646, 636, 623, 617, 613 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 38,65; H 2,43; N 14,09; nalezeno C 38,69; H 2,48; N 14,03.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-jodfenyl)propanamid (JD-P-I)**



Obrázek 45 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-jodfenyl)-propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> IN <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	497,21
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	34 %
Teplota tání:	253,0 °C
R <sub>f</sub>	0,88

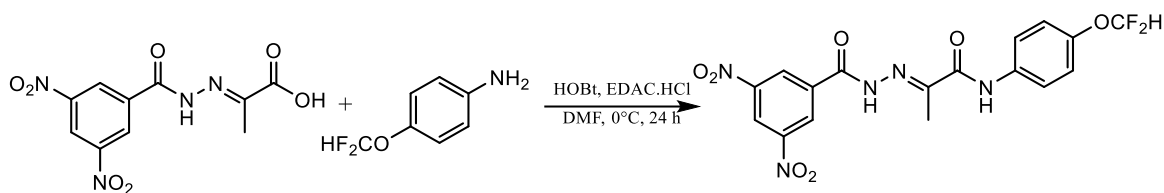
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.59 (s, 1H, CONHN), 10.13 (s, 1H, CONH), 9.01 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.97 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.66 – 7.54 (m, 4H, H<sub>2</sub>', H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>', H<sub>6</sub>'), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.46, 161.48, 152.50, 148.48, 138.60, 137.87, 136.66, 129.14, 122.89, 121.95, 88.17, 13.37.

IR: 3369, 3185, 3145, 3085, 3021, 1704, 1684, 1661, 1628, 1582, 1544, 1518, 1485, 1394, 1377, 1342, 1305, 1282, 1267, 1183, 1138, 1084, 921, 832, 822, 769, 744, 727, 713, 702, 685, 671, 653, 642, 633, 616, 605 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 38,65; H 2,43; N 14,09; nalezeno C 38,70; H 2,44; N 14,04.

**(E)-N-(4-difluormethoxyfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamid (JD-P-OCF<sub>2</sub>H)**



Obrázek 46 Schéma syntézy (E)-N-(4-difluormethoxyfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamidu

Sumární vzorec:

C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

Relativní molekulová hmotnost:

437,32

Popis:

Světle žlutá pevná látka

Výtěžek:

19 %

Teplota tání:

221,3 °C

R<sub>f</sub>

0,86

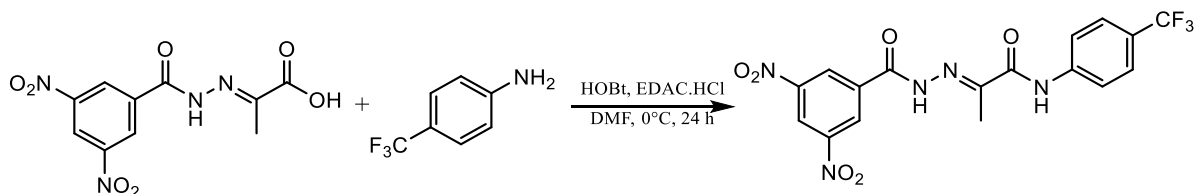
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.53 (s, 1H, CONHN), 10.14 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.99 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.76 (m, 2H, H<sub>2</sub>', H<sub>6</sub>'), 7.29 – 6.97 (m, 3H, H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>', OCF<sub>2</sub>H), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.26, 161.48, 152.75, 148.49, 147.31, 135.99, 130.73, 129.16, 122.21, 121.96, 119.83, 116.99 (t, *J* = 257.6 Hz), 13.43.

IR: 3320, 3104, 1687, 1664, 1628, 1539, 1511, 1379, 1344, 1288, 1267, 1218, 1175, 1160, 1112, 1077, 1047, 938, 921, 833, 746, 729, 718, 685, 653, 614 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 46,69; H 3,00; N 16,01; nalezeno C 46,65; H 3,05; N 16,00.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[4-(trifluormethyl)fenyl]-propanamid (JD-P-CF3)**



Obrázek 47 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[4-(trifluormethyl)fenyl]propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	439,31
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	33 %
Teplota tání:	200,7 °C
R <sub>f</sub>	0,89

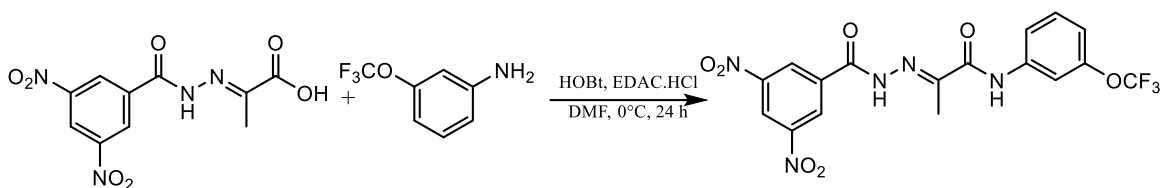
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.57 (s, 1H, CONHN), 10.41 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.98 – 7.94 (m, 2H, H<sub>3</sub>′, H<sub>5</sub>′), 7.69 – 7.65 (m, 2H, H<sub>2</sub>′, H<sub>6</sub>′), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.79, 161.53, 152.16, 148.47, 142.36, 136.44, 129.18, 126.48, 124.86 (q, *J* = 271.6 Hz), 124.54 – 122.20 (m), 122.03, 120.69, 14.61.

IR: 3113, 1683, 1670, 1614, 1528, 1410, 1346, 1319, 1298, 1267, 1242, 1183, 1153, 1118, 1066, 914, 843, 731, 716, 686, 653, 636, 617 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 46,68; H 2,75; N 15,94; nalezeno C 46,63; H 2,75; N 16,02.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[3-(trifluormethoxy)fenyl]propanamid  
(JD-M-OCF3)**



Obrázek 48 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[3-(trifluormethoxy)fenyl]propanamidu

Sumární vzorec:

C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

Relativní molekulová hmotnost:

455,31

Popis:

Světle žlutá pevná látka

Výtěžek:

62 %

Teplota tání:

138,5 °C

R<sub>f</sub>

0,88

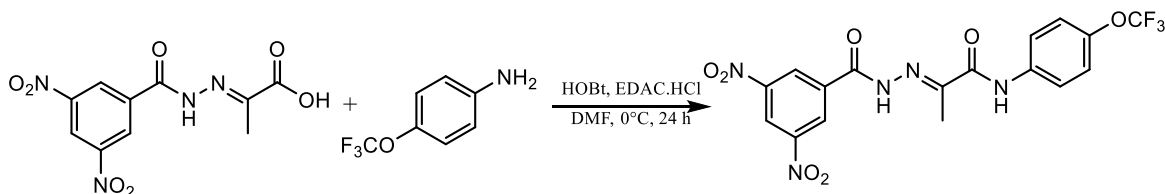
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.60 (s, 1H, CONHN), 10.38 (s, 1H, CONH), 9.03 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.92 – 7.87 (m, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.73 (s, 1H, H<sub>6</sub>'), 7.43 (s, 1H, H<sub>5</sub>'), 7.05 (s, 1H, H<sub>4</sub>'), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.71, 161.52, 152.43, 148.95, 148.48, 140.43, 136.62, 130.89, 129.15, 121.98, 120.63 (q, *J* = 256.4 Hz), 119.43, 116.42, 112.83, 13.38.

IR: 3102, 1681, 1667, 1629, 1612, 1537, 1494, 1371, 1344, 1263, 1217, 1168, 1139, 1080, 921, 776, 743, 729, 714, 684, 633, 614 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 44,85; H 2,66; N 15,38; nalezeno C 44,89; H 2,71; N 15,33.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-trifluormethoxyfenyl)propanamid (JD-P-OCF3)**



Obrázek 49 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-trifluormethoxyfenyl)propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	455,31
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	18 %
Teplota tání:	144,5 °C
R <sub>f</sub>	0,86

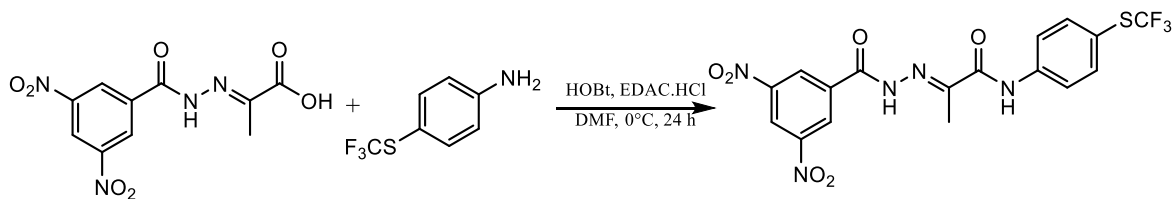
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 10.98 (s, 1H, CONHN), 10.07 (s, 1H, CONH), 9.13 – 9.09 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), 7.95 – 7.92 (m, 2H, H<sub>2</sub>′, H<sub>6</sub>′), 7.30 – 7.25 (m, 2H, H<sub>3</sub>′, H<sub>5</sub>′), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 161.95, 161.46, 149.99, 148.61, 144.78, 137.68, 136.59, 129.75, 128.54, 121.31, 120.84 (q, *J* = 249.9 Hz), 119.83, 10.56.

IR: 3261, 3098, 2922, 1693, 1662, 1546, 1525, 1509, 1342, 1266, 1221, 1202, 1175, 1163, 941, 746, 728, 715 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 44,85; H 2,66; N 15,38; nalezeno C 44,90; H 2,65; N 15,43.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[4-(trifluormethylthio)fenyl]propanamid  
(JD-P-SCF3)**



Obrázek 50 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[4-(trifluormethylthio)fenyl]propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S
Relativní molekulová hmotnost:	471,37
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	25 %
Teplota tání:	120,6 °C
R <sub>f</sub>	0,88

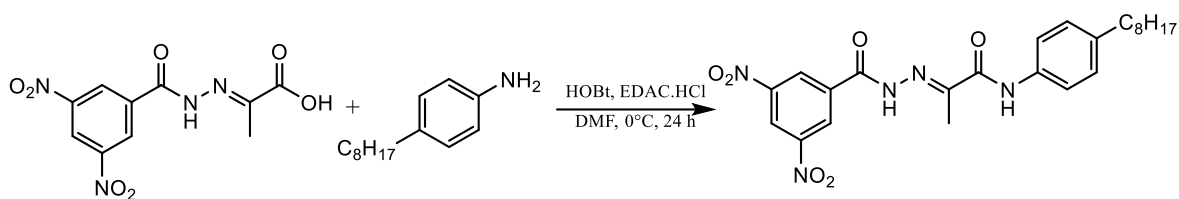
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 11.11 (s, 1H, CONHN), 10.38 (s, 1H, CONH), 9.12 – 9.07 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>), 7.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>' , H<sub>6</sub>' ), 7.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>3</sub>' , H<sub>5</sub>' ), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, aceton-*D*<sub>6</sub>) δ 162.25, 150.25, 148.58, 141.63, 137.29, 136.12, 129.94 (q, *J* = 307.4 Hz), 128.73, 128.61, 121.69, 120.73, 10.78.

IR: 3227, 3104, 1694, 1673, 1586, 1543, 1518, 1342, 1270, 1175, 1153, 1112, 1085, 850, 727, 715 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 43,32; H 2,57; N 14,86; nalezeno C 43,38; H 2,55; N 14,83.

**(E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-oktylfenyl)propanamid (JD-P-C8)**



Obrázek 51 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-oktylfenyl)propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	483,52
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	50 %
Teplota tání:	265,7 °C
R <sub>f</sub>	0,93

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.59 (s, 1H, CONHN), 9.90 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.62 – 7.58 (m, 2H, H<sub>2</sub>', H<sub>6</sub>'), 7.14 – 7.10 (m, 2H, H<sub>3</sub>', H<sub>5</sub>'), 2.50 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, Ph-C<sup>1</sup>H<sub>2</sub>), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.54 – 1.47 (m, 2H, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 1.27 – 1.17 (m, 10H, C<sup>3</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>4</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>5</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>6</sup>H<sub>2</sub>, C<sup>7</sup>H<sub>2</sub>), 0.81 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, C<sup>8</sup>H<sub>3</sub>).

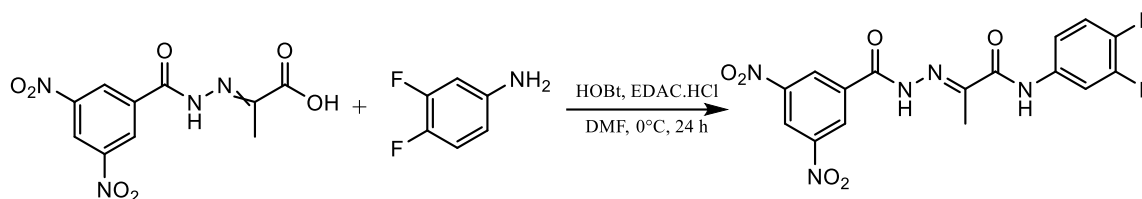
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 161.43, 152.88, 148.46, 138.49, 136.66, 136.30, 129.91, 129.18, 128.96, 120.62, 120.46, 40.60, 35.11, 31.80, 31.50, 29.36, 29.20, 29.16, 22.61, 14.48.

IR: 3268, 3112, 2918, 2854, 1693, 1662, 1630, 1621, 1593, 1543, 1523, 1471, 1434, 1412, 1368, 1342, 1329, 1294, 1271, 1178, 1151, 1137, 1120, 907, 843, 744, 728, 712, 681, 638, 617 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 59,62; H 6,05; N 14,48; nalezeno C 59,69; H 6,10; N 14,43.



**(E)-N-(3,4-difluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamid (JD-3,4-F)**



Obrázek 52 Schéma syntézy (E)-N-(3,4-difluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinylden]propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	407,29
Popis:	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	32 %
Teplota tání:	234,3 °C
R <sub>f</sub>	0,86

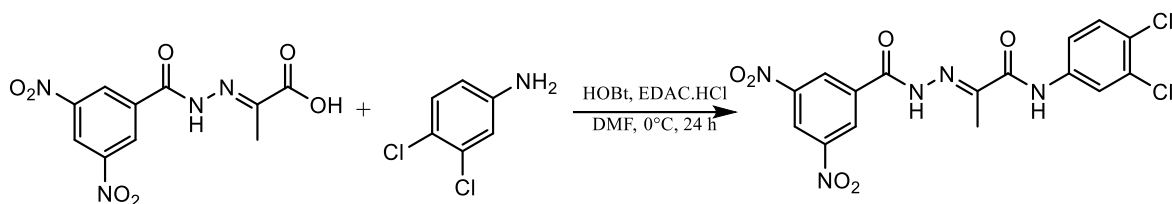
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.56 (s, 1H, CONHN), 10.32 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>), 8.98 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.88 (s, 1H, H<sub>2</sub>'), 7.54 (s, 1H, H<sub>5</sub>'), 7.36 (s, 1H, H<sub>6</sub>'), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.48, 161.53, 152.42, 149.39 (dd, *J* = 243.5, 13.0 Hz), 148.51, 145.92 (dd, *J* = 242.5, 12.6 Hz), 136.49, 135.84, 130.83, 129.17, 121.99, 117.85 (d, *J* = 17.6 Hz), 117.24 (d, *J* = 17.8 Hz), 13.37.

IR: 3336, 3242, 3109, 1693, 1665, 1651, 1628, 1539, 1520, 1427, 1374, 1343, 1271, 1240, 1205, 1187, 1168, 1118, 1091, 869, 832, 791, 756, 739, 731, 716, 694, 640, 633, 624, 614 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 47,18; H 2,72; N 17,20; nalezeno C 47,22; H 2,75; N 17,24.

**(E)-N-(3,4-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (JD-3,4-Cl)**



Obrázek 53 Schéma syntézy (E)-N-(3,4-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu

Sumární vzorec:  $C_{16}H_{11}Cl_2N_5O_6$

Relativní molekulová hmotnost: 440,19

Popis: Světle žlutá pevná látka

Výtěžek: 27 %

Teplota tání: 250,1 °C

R<sub>f</sub>: 0,89

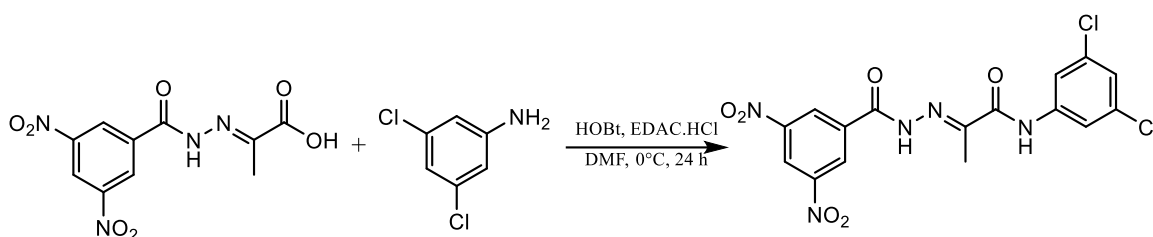
$^1H$  NMR (600 MHz, aceton- $D_6$ )  $\delta$  10.99 (s, 1H, CONHN), 10.17 (s, 1H, CONH), 9.12 – 9.09 (m, 3H, H2, H4, H6), 8.21 – 8.18 (m, 1H, H2'), 7.79 – 7.75 (m, 1H, H6'), 7.50 – 7.46 (m, 1H, H5'), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$  NMR (151 MHz, aceton- $D_6$ )  $\delta$  162.28, 156.33, 152.17, 148.61, 138.56, 136.46, 131.81, 130.54, 128.55, 126.17, 121.83, 121.45, 119.90, 10.58.

IR: 3335, 3213, 3092, 1688, 1666, 1582, 1540, 1514, 1477, 1466, 1385, 1373, 1342, 1268, 1202, 1170, 831, 747, 730, 716, 650, 641  $cm^{-1}$ .

EA: vypočteno C 43,66; H 2,52; N 15,91; nalezeno C 43,70; H 2,47; N 15,99.

**(E)-N-(3,5-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (JD-3,5-Cl)**



Obrázek 54 Schéma syntézy (E)-N-(3,5-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu

Sumární vzorec:  $C_{16}H_{11}Cl_2N_5O_6$

Relativní molekulová hmotnost: 440,19

Popis: Světle žlutá pevná látka

Výtěžek: 53 %

Teplota tání: 173,2 °C

R<sub>f</sub>: 0,91

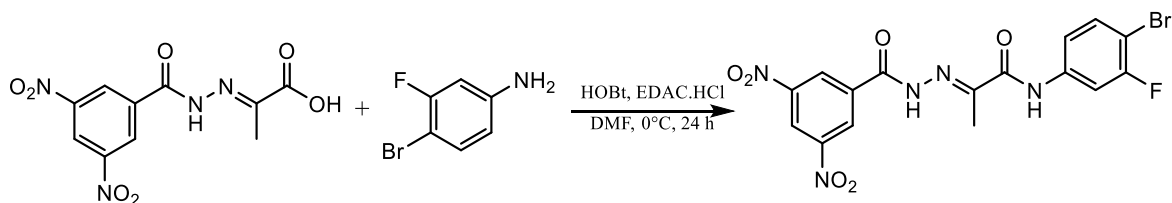
$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  11.59 (s, 1H, CONHN), 10.47 (s, 1H, CONH), 9.03 (s, 2H, H2, H6), 8.97 (s, 1H, H4), 7.87 (s, 2H, H2', H6'), 7.27 (s, 1H, H4'), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  163.96, 151.76, 148.44, 141.27, 136.77, 134.50, 129.14, 129.06, 123.54, 121.79, 118.91, 15.69.

IR: 3088, 1678, 1627, 1585, 1545, 1522, 1441, 1342, 1270, 1177, 1078, 920, 861, 803, 746, 728, 715, 691, 672, 650, 628, 604  $cm^{-1}$ .

EA: vypočteno C 43,66; H 2,52; N 15,91; nalezeno C 43,62; H 2,55; N 15,97.

**(E)-N-(4-brom-3-fluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (JD-Br-F)**



Obrázek 55 Schéma syntézy (E)-N-(4-brom-3-fluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu

Sumární vzorec:

$C_{16}H_{11}BrFN_5O_6$

Relativní molekulová hmotnost:

468,20

Popis:

Světle žlutá pevná látka

Výtěžek:

68 %

Teplota tání:

245,3 °C

R<sub>f</sub>

0,91

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  11.56 (s, 1H, CONHN), 10.37 (s, 1H, CONH), 9.02 (s, 2H, H2, H6), 8.96 (s, 1H, H4), 7.86-7.83 (m, 1H, H2'), 7.62-7.53 (m, 2H, H5', H6'), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

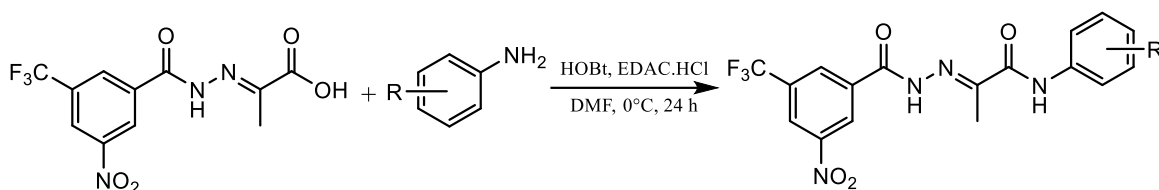
$^{13}C$  NMR (151 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  163.79, 158.45 (d,  $J = 242.1$  Hz), 151.21, 148.44, 140.06, 136.84, 133.73, 130.85, 129.06, 121.79, 118.14, 108.66, 101.99, 13.30.

IR: 3395, 3091, 1692, 1670, 1592, 1545, 1514, 1421, 1342, 1290, 1184, 1149, 1126, 921, 866, 824, 765, 731, 652, 622  $cm^{-1}$ .

EA: vypočteno C 41,05; H 2,37; N 14,96; nalezeno C 41,00; H 2,47; N 15,01.

#### 4.4. Syntéza (*E*)-*N*-fenyl-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidů

##### Obecný postupy syntézy

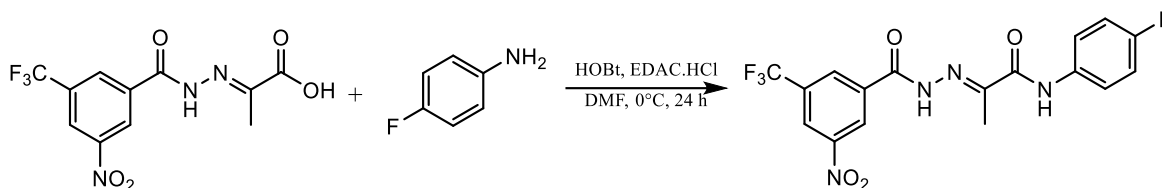


Obrázek 56 Schéma syntézy (*E*)-*N*-fenyl-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidů

2-{2-[3-Nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanová kyselina (319,2 mg, 1,0 mmol) a 1,1 ekvivalentu HOBt (148 mg) bylo rozpuštěno v 20 ml DMF za stálého míchání. Směs byla ochlazena ledovou lázní na 0 °C, byl přidán odpovídající substituovaný anilin (1,1 mmol), EDAC.HCl (2,6 mmol, 500 mg) a směs se ponechala míchat 24 hodin. Rozpouštědlo se odpařilo do sucha za sníženého tlaku a zbytek se rozpustil v 15 ml ethylacetátu. Reakční směs byla převedena do dělicí nálevky a vytřepána postupně s 15 ml vody, 2×15 ml 10% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 2×15 ml solanky. Organická vrstvila se oddělila a vysušila bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo se odpařilo do sucha pod sníženým tlakem. Pokud bylo potřeba, produkt se přečistil krystalizací z dichlormethanu.

[31]

**(E)-N-(4-fluorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinylden}propanamid  
(JD-CF3-PF)**



Obrázek 57 Schéma syntézy (E)-N-(4-fluorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinylden}propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	412,30
Popis	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	67 %
Teplota tání	246,9 °C
R <sub>f</sub>	0,88

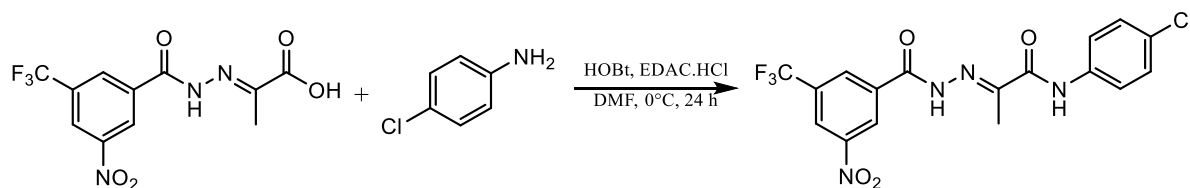
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.54 (s, 1H, CONHN), 10.08 (s, 1H, CONH), 8.89 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.68 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.62 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.74 (s, 2H, H<sub>2</sub>' , H<sub>6</sub>' ), 7.13 (s, 2H, H<sub>3</sub>' , H<sub>5</sub>' ), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.27, 161.96, 158.91 (d, *J* = 240.6 Hz), 152.42, 148.68, 136.68, 135.12, 131.45, 127.54, 124.22, 123.38 (q, *J* = 273.1 Hz), 122.62 (d, *J* = 8.0 Hz), 115.77 (d, *J* = 22.4 Hz), 14.60.

IR: 3376, 3208, 3105, 3061, 1671, 1543, 1528, 1508, 1411, 1393, 1371, 1356, 1326, 1316, 1302, 1277, 1240, 1207, 1186, 1147, 1111, 1100, 917, 837, 810, 786, 771, 763, 746, 726, 693, 652, 630 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 49,52; H 2,93; N 13,59; nalezeno C 49,50; H 2,97; N 13,54.

**(E)-N-(4-chlorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamid  
(JD-CF3-Cl)**



Obrázek 58 Schéma syntézy (E)-N-(4-chlorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	428,75
Popis	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	72 %
Teplota tání	256,6 °C
R <sub>f</sub>	0,89

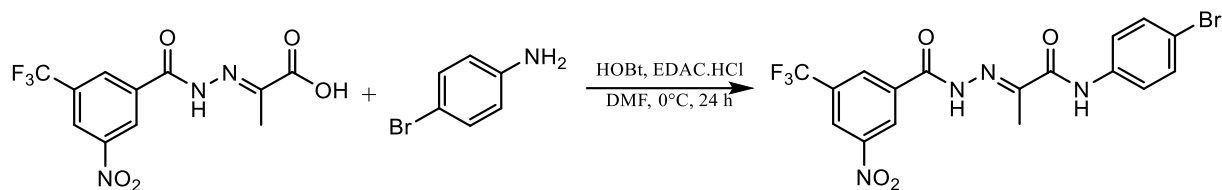
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.46 (s, 1H, CONHN), 10.16 (s, 1H, CONH), 8.89 (s, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H4), 8.62 (s, 1H, H6), 7.76 (s, 2H, H2', H6'), 7.35 (s, 2H, H3', H5'), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.45, 161.96, 152.31, 148.68, 137.73, 136.70, 131.45, 129.10, 128.03, 127.55, 124.02, 123.30 (q, *J* = 273.1 Hz), 122.32, 13.37.

IR: 3389, 3207, 3101, 3060, 1691, 1671, 1539, 1521, 1492, 1405, 1390, 1352, 1324, 1313, 1302, 1275, 1268, 1185, 1149, 1110, 1096, 915, 833, 819, 764, 741, 692, 653, 616 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 47,62; H 2,82; N 13,07; nalezeno C 47,67; H 2,77; N 13,04.

**(E)-N-(4-bromfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamid  
(JD-CF3-PBr)**



Obrázek 59 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu

Sumární vzorec:  $C_{17}H_{12}BrF_3N_4O_4$

Relativní molekulová hmotnost: 473,21

Popis: Světle žlutá pevná látka

Výtěžek: 48 %

Teplota tání: 242,1 °C

R<sub>f</sub>: 0,89

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  11.48 (s, 1H, CONHN), 10.20 (s, 1H, CONH), 8.92 (s, 1H, H2), 8.72 (s, 1H, H4), 8.65 (s, 1H, H6), 7.74 (s, 2H, H2', H6'), 7.51 (s, 2H, H3', H5'), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

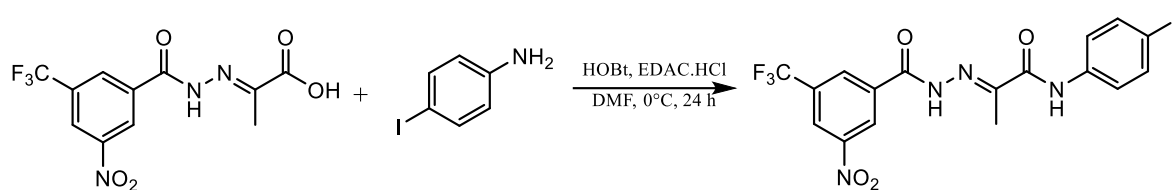
$^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  163.40, 161.92, 152.18, 148.60, 138.07, 136.54, 131.93, 131.36, 127.49, 123.97, 123.22 (q,  $J = 273.2$  Hz), 122.59, 116.02, 13.28.

IR: 3392, 3325, 3204, 3098, 1691, 1667, 1587, 1538, 1516, 1491, 1398, 1354, 1325, 1283, 1272, 1238, 1181, 1146, 1110, 1096, 1075, 908, 830, 740, 732, 693, 683, 651, 615  $cm^{-1}$ .

EA: vypočteno C 43,15; H 2,56; N 11,84; nalezeno C 43,20; H 2,67; N 12,00.



**(E)-N-(4-iodfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinylden}propanamid  
(JD-CF3-PI)**



Obrázek 60 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinylden}propanamidu

Sumární vzorec:	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> IN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Relativní molekulová hmotnost:	520,21
Popis	Světle žlutá pevná látka
Výtěžek:	25 %
Teplota tání	237,6 °C
R <sub>f</sub>	0,91

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 11.48 (s, 1H, CONHN), 10.16 (s, 1H, CONH), 8.92 (s, 1H, H<sub>2</sub>), 8.71 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 8.65 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.69 – 7.59 (m, 4H, H<sub>2</sub>' , H<sub>3</sub>' , H<sub>5</sub>' , H<sub>6</sub>' ), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 163.09, 161.64, 151.87, 148.32, 138.26, 137.50, 136.27, 131.12, 127.22, 123.67, 122.95 (q, *J* = 273.2 Hz), 122.55, 87.84, 13.00.

IR: 3385, 3085, 1685, 1667, 1581, 1546, 1512, 1487, 1436, 1421, 1398, 1386, 1365, 1351, 1317, 1307, 1267, 1171, 1148, 1135, 1110, 1095, 909, 831, 764, 694, 685, 652, 612 cm<sup>-1</sup>.

EA: vypočteno C 39,25; H 2,33; N 10,77; nalezeno C 39,27; H 2,34; N 10,82.

## 5 Biologické hodnocení

### 5.1. Metodika [34]

Nasyntetizované látky byly hodnoceny *in vitro* jako potenciální sloučeniny účinné proti mykobakteriím. Testovanými kmeny byly *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 v ředění  $10^{-3}$  a tři kmeny netuberkulózních mykobakterií: *Mycobacterium avium* 330/88 (rezistentní na ethambutol, rifampicin, isoniazid a ofloxacin; ředění  $10^{-5}$ ), *Mycobacterium kansasii* 138/18 (ředění  $10^{-4}$ ) a *Mycobacterium kansasii* 235/80 (ředění  $10^{-4}$ ). Kmen 331/88 je plně citlivý a odpovídá standardnímu kmeni H<sub>37</sub>R<sub>v</sub>, zatímco *M. kansasii* byly izoláty od pacienta.

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací bylo prováděno mikrometodou v Middlebrookově tekuté půdě v plastických P-destičkách. Testované látky byly naředěny pomocí DMSO, tak aby výsledné koncentrace činily násobky dvou v  $\mu\text{M}$ , a to v intervalu 1-1000  $\mu\text{M}$ . Výsledná koncentrace DMSO byla 1 % a neovlivnila růst mykobakterií. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly odečteny po 14 a 21 dnech při 37 °C, u *M. kansasii* rovněž i po 7 dnech.

MIC hodnota udává nejnižší koncentraci, při které byla pozorována úplná inhibice růstu mykobakterií. Jakožto referenční látky byly použity isoniazid a oba dva výchozí nesubstituované hydrazidy. INH byl naředěn destilovanou vodou, hydrazidy pak pomocí DMSO jako testované sloučeniny. Testování bylo provedeno externě ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, laboratoři pro diagnostiku mykobakterií, pod vedením RNDr. Jiřiny Stolaříkové.

## 6 Výsledky a diskuse

### 6.1. Chemická část

Bylo připraveno celkem osmnáct substituovaných *N*-fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidů. Sloučeniny se lišily substituenty na anilinu – jeden substituent v poloze 3 nebo 4, disubstituce v polohách 3 a 4 nebo 3 a 5. Rovněž byly připraveny čtyři substituované *N*-fenyl-2-[2-(3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl)hydrazinyliden]propanamidy s halogeny v poloze 4.

Kyselina 2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanová byla připravena postupnou syntézou z kyseliny 3,5-dinitrobenzoové esterifikací methanolem v přítomnosti kyselého katalyzátoru (koncentrovaná kyselina sírová), hydrazinolýzou esteru hydrazin hydrátem za vzniku hydrazidu a následované kondenzací s kyselinou pyrohroznovou. [31], [32], [33] Reakce proběhly spolehlivě s vysokým výtěžkem, rovněž i purifikace meziproductů a finálního produktu extrakcí proběhla bez větších obtíží.

Podobně byla připravena i kyselina 2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanová, jejíž syntéza navíc zahrnovala nitraci kyseliny 3-trifluormethylbenzoové nitrační směsí v prvním kroku. [31], [33]

Hydrazony se připravily reakcí předpřipraveného klíčového intermediátu, kyseliny (*E*)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanové s daným anilinem v DMF couplingem s nadbytkem EDC.HCl za chlazení. [31] Zamezení tvorby vedlejších produktů bylo podpořeno právě již zmíněnou nízkou teplotou a přidavkem HOBt, který sloužil jako aktivující a zároveň dobře odstupující skupina. Čištění reakční směsi bylo poměrně snadné kvůli dobré rozpustnosti katalyzátoru, vznikající močoviny, nezreagované kyseliny a anilinu ve vodné fázi, případně po reakci s přítomnou bází. Produkt se naopak rozpouštěl v ethyl-acetátu, tudíž se jeho ethyl-acetátový roztok dal snadno vytřepat vodou, roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou. Finální pevná látka se získala buď odpařením ethyl-acetátu, jejím dodatečným rozpuštěním v minimálním množství dichlormethanu a krystalizací při -20 °C, či sloupcovou chromatografií.

Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 7-72 %. Vyšší výtěžnost vykazovaly deriváty s trifluormethylovou skupinou místo nitroskupiny, což lze vysvětlit zvýšenou lipofilitou celé molekuly. Nejnižší výtěžek se vyskytl u (*E*)-*N*-(4-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-

dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu (**JD-P-Cl**), pravděpodobně je to způsobeno příliš velkou rozpustností v dichlormethanu.

(*E*)-2-[2-(3,5-Dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]propanamid (**JD-P-CF3**) byl přečištěn kolonovou chromatografií s použitím směsi dichlormethan a methanol v poměru 98:2 (v/v) jako mobilní fáze (MF). Tímto způsobem byly přečištěny i (*E*)-*N*-(3,4-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (**JD-3,4-Cl**) a (*E*)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-*N*-(4-trifluormethoxyfenyl)propanamid (**JD-P-OCF3**), zde ovšem v poměru složek MF 99,5:0,5, stejně jako (*E*)-*N*-(4-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (**JD-P-Br**) a (*E*)-*N*-(3,4-difluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid (**JD-3,4-F**). (*E*)-2-[2-(3,5-Dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-*N*-(4-trifluormethylthiofenyl)propanamid (**JD-P-SCF3**) se plánoval přečistit kolonovou chromatografií ve směsi dichlormethan:methanol v poměru 93:7 (v/v), avšak při snaze rozpustit reakční směs produkt samovolně vykrytalizoval a byl získán filtrací. (*E*)-2-[2-(3,5-Dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-*N*-(3-trifluormethoxyfenyl)propanamid (**JD-M-OCF3**) byl rekrystalizován ze směsi ethyl-acetátu a etheru.

Všechny sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR, stanovení  $R_f$  a teploty tání, čistota byla dále ověřena pomocí elementární analýzy. Byly získány v dostatečném množství pro hodnocení biologické aktivity.

## 6.2. Biologická část

### 6.2.1. Výsledky hodnocení aktivity proti *Mtb.*, *M. avium* a *M. kansasii*

Výsledky měření MIC jsou uvedené v tabulce, nejlepší hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Látky	MIC [ $\mu\text{M}$ ]						
	<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 138/18 (235/80)		
	14 dní	21 dní	14 dní	21 dní	7 dní	14 dní	21 dní
JD-M-F	64	125	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-P-F	250nárůst	250 nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-M-Cl	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
JD-P-Cl	32	32	250nárůst	250nárůst	32	32	64
JD-M-Br	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
JD-P-Br	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>250</b>	500nárůst	<b>8</b>	16	<b>16</b>
JD-M-I	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
JD-P-I	<b>4</b>	<b>8</b>	500 nárůst	500nárůst	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>
JD-P-OCF2H	32	32	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
JD-P-CF3	8	16	500 nárůst	500 nárůst	<b>8</b>	16	<b>16</b>
JD-M-OCF3	125	125	250nárůst	250nárůst	125	125	125
JD-P-OCF3	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>250</b>	500 nárůst	<b>8</b>	16	32
JD-P-SCF3	32	32	250nárůst	250nárůst	64	64	64
JD-P-C8	64	64	<b>250</b>	500nárůst	125	250	250
JD-3,4-F	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-3,4-Cl	8	16	500nárůst	500nárůst	32	64	125
JD-3,5-Cl	32	32	250nárůst	250nárůst	32	32	64
JD-Br-F	32	32	250nárůst	250nárůst	32	32	64
JD-CF3-PF	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-CF3-PCI	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-CF3-PBr	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
JD-CF3-PI	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst	250nárůst
3,5-dinitrobenzohydrazid	125	250	500	500	250	500	500
3-NO <sub>2</sub> -5-CF <sub>3</sub> -benzohydrazid	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
INH	0,5	0,5	250	>250	2	2	4

Tabulka 2 Změřené hodnoty MIC

Zkratky použité v tabulce:

INH           isoniazid

*Mtb.*           *Mycobacterium tuberculosis*

### 6.2.2. Diskuse – biologická část

Rozsah MIC sloučenin u *Mtb.* činil od 4  $\mu\text{M}$  po 14 dnech a od 8  $\mu\text{M}$  po 21 dnech. V obou případech nejlepších výsledků dosáhly halogenované sloučeniny s bromem (**JD-P-Br**), jodem (**JD-P-I**) či trifluormethoxy skupinou (**JD-P-OCF3**) v poloze *para*. MIC referenčního léčiva isoniazidu za stejných podmínek byla 0,5  $\mu\text{M}$ .

U *M. kansasii* byly výsledky obdobné, ačkoli hodnoty MIC byly mírně vyšší. Nejlépe dopadly tři již výše zmíněné látky a rovněž i molekula s trifluormethylovou skupinou v poloze *para* (**JD-P-CF3**).

V případě *M. avium* byly výsledky podstatně horší, hodnoty MIC činily 250  $\mu\text{M}$  a více. Ovšem zde i referenční INH dosáhl MIC  $\geq 250 \mu\text{M}$ .

Pokud rozebereme vztah struktury a účinku, můžeme vypočítat několik jevů. Při srovnání substituce stejným halogenem, avšak v různých polohách na fenylu, vidíme, že mnohem účinnější byla substituce v poloze *para* oproti *meta*. Pokud vezmeme v potaz počet substituentů, pozorujeme nižší MIC u monosubstituovaných derivátů. Rovněž můžeme z výsledků usoudit, že se výměna nitro skupiny za trifluormethylovou neosvědčila. Derivát s *n*-oktylem na benzenovém jádře neprokázal příliš velkou inhibiční aktivitu, halogenované deriváty si vedly lépe. Při porovnání látek s korespondujícím hydrazidem, pozorujeme různé výsledky. Zatímco u 3,5-dinitrobenzohydrazidu se substituce kyselinou pyrohroznovou a amidicky vázaným substituovaným fenylem ve většině případů osvědčila, u 3-nitro-5-(trifluormethyl)benzohydrazidu žádný takový záměr z hlediska aktivity nemáme, neboť se nepodařilo stanovit přesné hodnoty MIC těchto derivátů ( $>250 \mu\text{M}$ ).

Obecně lze shrnout, že nejvhodnější substituce v těchto derivátech byla v *para* poloze jedním atomem halogenu, zejména s vyšším protonovým číslem (Br, I), či halogeny substituovaným uhlíkem ( $\text{OCF}_3 \geq \text{CF}_3 > \text{OCF}_2 = \text{SCF}_3$ ). Náhrada jedné nitro skupiny za trifluormethyl je nevýhodná. Např. u odpovídajících 4-bromanilinových (**JD-P-Br** a **JF-CF3-PBr**) a 4-jodanilinových (**JD-P-I** a **JF-CF3-PI**) derivátů došlo u *M. tuberculosis* při čtrnáctidenní inkubaci k mnohanásobnému poklesu aktivity (MIC 4  $\mu\text{M}$  vs.  $>250 \mu\text{M}$ ), podobně tomu bylo i u *M. kansasii*.

## 7 Závěr

Celkem se povedlo připravit dvacet dva nových sloučenin: osmnáct 3,5-dinitroderivátů a čtyři 5-nitro-3-trifluormethylderiváty, a jejich prekursory. Samotné sloučeniny se lišily substitucí na benzenovém jádře anilinu. Jednalo se především o halogenové substituenty. Většina látek musela být přečištěna, nicméně byly získány v dostatečném množství pro charakterizaci a stanovení čistoty (NMR, IR, EA, teplota tání) a zejména biologické hodnocení v aktivitě proti mykobakteriálním kmenům.

Byl popsán vliv substituentů na minimální inhibiční koncentraci. Nejúčinnějšími látkami proti lékově citlivému kmeni *Mtb.* se ukázaly být **JD-P-Br**, **JD-P-I** a **JD-P-OCF<sub>3</sub>** s MIC 4-8  $\mu\text{M}$ . Tito zástupci rovněž prokázali aktivitu proti *M. kansasii* s MIC 4-16  $\mu\text{M}$ . Proti *M. avium* neprokázala ani jedna látka významnou aktivitu. (MIC  $\geq 250 \mu\text{M}$ ) Tyto látky na základě analogie pravděpodobně působí přes vazbu na DprE1, enzym hrající důležitou roli v tvorbě buněčné stěny, což ale musí být ověřeno experimentálně.

Látky prokázaly inhibiční potenciál, avšak nižší než již zavedený INH. V dalším kroku budou látky testovány na citlivost vůči MDR-TB kmenům, bakteriím a houbám ke stanovení selektivity účinku na mykobakterie. Dále podstoupí i testování na cytotoxicitu a potvrzení výše zmíněného mechanismus účinku.

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1 Vzorec isoniazidu.....	13
Obrázek 2 Vzorec rifampicinu .....	13
Obrázek 3 Vzorec ethambutolu.....	13
Obrázek 4 Vzorec pyrazinamidu .....	14
Obrázek 5 Vzorec streptomycinu .....	14
Obrázek 6 Obecný mechanismus redukce aromatických nitrosloúčenin [12].....	15
Obrázek 7 Mutagenní působení nitroaromátů [14] .....	15
Obrázek 8 Struktura metronidazolu [15].....	16
Obrázek 9 Metronidazolové hybridy - NO donory [12].....	17
Obrázek 10 Metronidazol-chinolinové hybridy [12] .....	17
Obrázek 11 Struktura 4-[2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethoxy]benzoové kyseliny [15].....	18
Obrázek 12 Struktura seknidazolu [15] .....	18
Obrázek 13 Struktura tinidazolu [15] .....	18
Obrázek 14 Struktura ornidazolu [15] .....	19
Obrázek 15 Struktura satranidazolu [15] .....	19
Obrázek 16 Struktury antimykobakteriálně aktivních 4-nitroimidazolů [12] .....	20
Obrázek 17 Struktura megazolu [19].....	21
Obrázek 18 Struktury 2-nitroimidazolů [12].....	21
Obrázek 19 Struktury některých nitrofuranů a nitrothiofenů [12] .....	22
Obrázek 20 Vzorec nifuroxazidu [15] .....	23
Obrázek 21 Struktura nitrofuran-triazolových hybridů[15] .....	23
Obrázek 22 Struktura 3-(5-nitrofuran-2-yl)-5-{4-[4-(4-trifluormethylfenoxy)piperidin-1-yl]fenyl}-4,5-dihydroisoxazolu [15] .....	24
Obrázek 23 Struktura 2-[(3,4-dibrom-5-nitrofuran-2-yl)methylen]-N-fenylhydrazin-1-karbothioamidu [15].....	24
Obrázek 24 Struktura 1-(5-chlor-2-thienyl)-2-[[5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]thio]ethan-1-onu [15].....	24
Obrázek 25 Struktura 2-[4-[(4-chlorfenyl)(fenyl)methyl]piperazin-1-yl]-N-(5-nitrothiazol-2-yl)acetamidu [15].....	25
Obrázek 26 Struktura BTZ043 [12] .....	25
Obrázek 27 Struktura makozinonu [25] .....	25
Obrázek 28 Struktury amfenikolů [26] .....	26
Obrázek 29 Struktura niklosamidu [15].....	27
Obrázek 30 Struktura oxamnichinu [15] .....	27
Obrázek 31 Struktura nitroxolinu [15].....	28
Obrázek 32 Struktury derivátů N-(2-fenoxyethyl)imidazol[1,2-a]pyridin-3-karboxamidu a 1-[4-[[2-(2,4-dinitrofenyl) hydrazon]methyl]fenyl]-1H-1,2,4-triazolu [13].....	28
Obrázek 33 Struktury 2-(1-benzoyl-1H-benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N-substituovaných amidů [13].....	29
Obrázek 34 Schéma cíle diplomové práce.....	30
Obrázek 35 Schéma syntézy kyseliny (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanové .....	33



Obrázek 36 Schéma syntézy kyseliny (E)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanové .....	34
Obrázek 37 Schéma syntézy (E)-N-fenyl-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamid.....	34
Obrázek 38 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-fluorfenyl)propanamidu .....	35
Obrázek 39 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-fluorfenyl)propanamidu .....	36
Obrázek 40 Schéma syntézy (E)-N-(3-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	37
Obrázek 41 Schéma syntézy (E)-N-(4-chlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	38
Obrázek 42 Schéma syntézy (E)-N-(3-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	39
Obrázek 43 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	40
Obrázek 44 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-jodfenyl)propanamidu.....	41
Obrázek 45 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-jodfenyl)propanamidu .....	42
Obrázek 46 Schéma syntézy (E)-N-(4-difluormethoxyfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	43
Obrázek 47 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-(trifluormethyl)fenyl)propanamidu .....	44
Obrázek 48 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(3-trifluormethoxyfenyl)propanamidu .....	45
Obrázek 49 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-trifluormethoxyfenyl)propanamidu .....	46
Obrázek 50 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-[4-(trifluormethylthio)fenyl]propanamidu .....	47
Obrázek 51 Schéma syntézy (E)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]-N-(4-oktylfenyl)propanamidu .....	48
Obrázek 52 Schéma syntézy (E)-N-(3,4-difluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	49
Obrázek 53 Schéma syntézy (E)-N-(3,4-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	50
Obrázek 54 Schéma syntézy (E)-N-(3,5-dichlorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	51
Obrázek 55 Schéma syntézy (E)-N-(4-brom-3-fluorfenyl)-2-[2-(3,5-dinitrobenzoyl)hydrazinyliden]propanamidu.....	52
Obrázek 56 Schéma syntézy (E)-N-fenyl-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidů .....	53
Obrázek 57 Schéma syntézy (E)-N-(4-fluorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu .....	54

Obrázek 58 Schéma syntézy (E)-N-(4-chlorfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu .....	55
Obrázek 59 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu .....	56
Obrázek 60 Schéma syntézy (E)-N-(4-bromfenyl)-2-{2-[3-nitro-5-(trifluormethyl)benzoyl]hydrazinyliden}propanamidu .....	57

## 9 Seznam tabulek

Tabulka 1 Léčiva na MDR-TB [4] .....	12
Tabulka 2 Změřené hodnoty MIC .....	61

## 10 Seznam použité literatury

- [1] I. Solovič, „Tuberkulóza - aktuálny problém aj v novom miléniu.“, *Neurologie pro praxi*, roč. 20, č. 2, s. 91–97, 2019, doi: <https://doi.org/10.36290/neu.2018.063>.
- [2] M. Vašáková, „Současný přístup k diagnostice, léčbě a prevenci tuberkulózy.“, *Vnitřní lékařství*, roč. 63, č. 11, s. 815–820, 2019, doi: <https://doi.org/10.36290/vnl.2017.154>.
- [3] I. Suárez, S. M. Fünfer, J. Rademacher, G. Fätkenheuer, S. Kröger, a J. Rybniker, „The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis“, *Deutsches Arzteblatt International*, roč. 116, č. 43. Deutscher Arzte-Verlag GmbH, s. 729–735, říjen 2019. doi: 10.3238/arztebl.2019.0729.
- [4] J. Wallenfels, M. Vašáková, a I. Solovič, „Aktuální farmakoterapie tuberkulózy“, *Praktické lékařství*, roč. 15, s. 28–36, 2019. [Online]. Dostupné z: [www.praktickelekarenstvi.cz](http://www.praktickelekarenstvi.cz)
- [5] J. Homolka, M. Koziar-Vašáková, I. Hricíková, a S. Kos, „Aktualizace doporučeného postupu léčby tuberkulózy dospělých 2023“. [Online]. Dostupné z: <https://www.plicnikarstvi.cz/upload/1685970285.0432.docx>
- [6] H. S. Schaaf a J. Hughes, „Current Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis in Children“, *Indian Journal of Pediatrics*. Springer, 2023. doi: 10.1007/s12098-023-04888-z.
- [7] *Rang & Dale's Pharmacology*, 9. Elsevier Saunders, 2019.
- [8] Y. Y. Huang *et al.*, „Characterization of Mutations in Genes Related to Rifampicin and Isoniazid Resistance in Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Hangzhou, China“, *Biomedical and Environmental Sciences*, roč. 36, č. 9, s. 869–873, doi: 10.3967/bes2023.112.
- [9] *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 6. Elsevier, 2018.

- [10] N. Poladian *et al.*, „Role of NF- $\kappa$ B during *Mycobacterium tuberculosis* Infection", *International Journal of Molecular Sciences*, roč. 24, č. 2. MDPI, leden 2023. doi: 10.3390/ijms24021772.
- [11] P. Gopal *et al.*, „Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase", *Nature Communications*, roč. 11, č. 1, prosinec 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15516-1.
- [12] A. M. Rice, Y. Long, a S. B. King, „Nitroaromatic antibiotics as nitrogen oxide sources", *Biomolecules*, roč. 11, č. 2. MDPI AG, s. 1–28, únor 2021. doi: 10.3390/biom11020267.
- [13] C. B. Scarim a F. R. Pavan, „Recent advancement in drug development of nitro(NO<sub>2</sub>)-heterocyclic compounds as lead scaffolds for the treatment of *Mycobacterium tuberculosis*", *Drug Development Research*, roč. 83, č. 4. John Wiley and Sons Inc, s. 842–858, červen 2022. doi: 10.1002/ddr.21921.
- [14] K. Nepali, H. Y. Lee, a J. P. Liou, „Nitro-Group-Containing Drugs", *Journal of Medicinal Chemistry*, roč. 62, č. 6. s. 2851–2893, březen 2019. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00147.
- [15] Kannigadu Ch. a N'Da. David D., „Recent Advances in the Synthesis and Development of Nitroaromatics as Anti-Infective Drugs", *Current Pharmaceutical Design*, roč. 26, s. 4658–4674, 2020, doi: 10.2174/1381612826666200331091853.
- [16] S. Khoshnood *et al.*, „Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*", *Frontiers in Microbiology*, roč. 12. Frontiers Media S.A., říjen 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.717045.
- [17] K. A. Abrahams, S. M. Batt, S. S. Gurcha, N. Veerapen, G. Bashiri, a G. S. Besra, „DprE2 is a molecular target of the anti-tubercular nitroimidazole compounds pretomanid and delamanid", *Nature Communications*, roč. 14, č. 1, prosinec 2023, doi: 10.1038/s41467-023-39300-z.

- [18] B. Enanga, M. R. Ariyanayagam, M. L. Stewart, a M. P. Barrett, „Activity of megazol, a trypanocidal nitroimidazole, is associated with DNA damage", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, roč. 47, č. 10, s. 3368–3370, říj. 2003, doi: 10.1128/AAC.47.10.3368-3370.2003.
- [19] A. S. de Carvalho *et al.*, „Megazol and its bioisostere 4H-1,2,4-triazole: Comparing the trypanocidal, cytotoxic and genotoxic activities and their in vitro and in silico interactions with the *Trypanosoma brucei* nitroreductase enzyme", *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, roč. 109, č. 3, s. 315–323, 2014, doi: 10.1590/0074-0276140497.
- [20] N. S. Hochberg a S. P. Montgomery, „Chagas Disease", *Annals of Internal Medicine*, roč. 176, č. 2, s. ITC17–ITC32, únor 2023, doi: 10.7326/AITC202302210.
- [21] J. Recht, V. Chansamouth, N. J. White, a E. A. Ashley, „Nitrofurantoin and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A safety review", *JAC-Antimicrobial Resistance*, roč. 4, č. 3. Oxford University Press, červen 2022. doi: 10.1093/jacamr/dlac045.
- [22] J. Pepin a F. Milord, „The Treatment of Human African Trypanosomiasis", 1994.
- [23] H. S. Althagafy, M. K. A. El-Aziz, I. M. Ibrahim, E. K. Abd-alhameed, a E. H. M. Hassanein, „Pharmacological updates of nifuroxazide: Promising preclinical effects and the underlying molecular mechanisms", *European Journal of Pharmacology*, roč. 951. Elsevier B.V., červenec 2023. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175776.
- [24] R. W. Seidel, A. Richter, R. Goddard, a P. Imming, „Synthesis, structures, reactivity and medicinal chemistry of antitubercular benzothiazinones", *Chemical Communications*, roč. 59, č. 32, s. 4697–4715, březen 2023, doi: 10.1039/d3cc00356f.
- [25] M. Imran *et al.*, „An insight into the discovery, clinical studies, compositions, and patents of macozinone: A drug targeting the DprE1 enzyme of

- Mycobacterium tuberculosis*", *Journal of Infection and Public Health*, roč. 15, č. 10. Elsevier Ltd, s. 1097–1107, říjen 2022. doi: 10.1016/j.jiph.2022.08.016.
- [26] J. Liu *et al.*, „Unified Strategy to Amphenicol Antibiotics: Asymmetric Synthesis of (-)-Chloramphenicol, (-)-Azidamphenicol, and (+)-Thiamphenicol and Its (+)-3-Fluoride", *Journal of Organic Chemistry*, roč. 85, č. 23, s. 15360–15367, prosinec 2020, doi: 10.1021/acs.joc.0c02181.
- [27] S. Schwarz, C. Kehrenberg, B. Doublet, a A. Cloeckert, „Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol", *FEMS Microbiology Reviews*, roč. 28, č. 5, s. 519–542, listopad 2004. doi: 10.1016/j.femsre.2004.04.001.
- [28] H. Jiang, A. M. Li, a J. Ye, „The magic bullet: Niclosamide", *Frontiers in Oncology*, roč. 12., listopad 2022. doi: 10.3389/fonc.2022.1004978.
- [29] V. B. R. da Silva, B. R. K. L. Campos, J. F. de Oliveira, J. L. Decout, a M. do Carmo Alves de Lima, „Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, roč. 25, č. 13, s. 3259–3277, 2017. doi: 10.1016/j.bmc.2017.04.031.
- [30] R. Wykowski, A. M. Fuentefria, a S. F. de Andrade, „Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review", *Archives of Microbiology*, roč. 204, č. 8. srpen 2022. doi: 10.1007/s00203-022-03122-2.
- [31] V. Pflégr *et al.*, „Design and synthesis of 2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene)propanamides as InhA inhibitors with high antitubercular activity", *European Journal of Medicinal Chemistry*, roč. 223, listopad 2021, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113668.
- [32] M. Pošta, V. Soós, a P. Beier, „Design of photoaffinity labeling probes derived from 3,4,5-trimethylfuran-2(5H)-one for mode of action elucidation", *Tetrahedron*, roč. 72, č. 27–28, s. 3809–3817, 2016, doi: 10.1016/j.tet.2016.03.096.
- [33] G. Karabanovich *et al.*, „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*, roč. 126, s. 369–383, 2017, doi:  
10.1016/j.ejmech.2016.11.041.

- [34] M. Krátký, J. Vinšová, E. Novotná, J. Mandíková, F. Trejtnar, a J. Stolaříková,  
„Antibacterial activity of salicylanilide 4-(trifluoromethyl)benzoates",  
*Molecules*, roč. 18, č. 4, s. 3674–3688, duben 2013, doi:  
10.3390/molecules18043674.