

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**SYNTÉZA A HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH LÉČIV
NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB**

Diplomová práce

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

Konzultant: Mgr. Enikő Šikorová

Hradec Králové 2024

Eva Foltýnová

PROHLÁŠENÍ

„Čestně prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a všechny myšlenky, data a jejich zdroje, ze kterých jsem při zpracování práce čerpala, řádně cituji. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 14. 5. 2024

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady v průběhu teoretické i experimentální části. Dále chci velmi poděkovat Mgr. Enikő Šikorové za její pomoc při syntézách látek a za její praktické rady při zpracování experimentální části této práce. Zároveň bych chtěla poděkovat paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., za testování enzymové inhibice, paní RNDr. Jiřině Stolaříkové a Mgr. Janě Korbielové za testování antimykobakteriální aktivity. Dále bych chtěla poděkovat paní Idě Dufkové za testování antibakteriální a antifungální aktivity. Také chci poděkovat mé rodině, která mi dávala podporu v průběhu celého studia.

Práce byla podpořena z prostředků projektů Národního institutu virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU a Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NW24-05-00549.

ABSTRAKT

Tématem této diplomové práce je syntéza derivátů oxadiazolu a jejich prekurzorů jako potenciálních léčiv neurodegenerativních chorob a jejich následné hodnocení především jako potenciálních inhibitorů cholinesteráz (CHE).

Teoretická část této práce se věnuje Alzheimerově chorobě, především její patofyziologii, diagnostice a léčbě. Dále se zabývá také inhibitory CHE, které jsou již klinicky využívané, i novým strukturám s potenciálem mít v budoucnu klinické využití. Také se věnuje oxadiazolovému fragmentu, jeho chemickým i biologickým vlastnostem.

V rámci experimentální práce byly nasyntetizovány deriváty 1,3,4- a 1,2,4-oxadiazolu, které se lišily kromě typu oxadiazolu také jejich substitucí. Tyto látky byly připravené pomocí cyklizace prekurzorů, které byly také připraveny a otestovány. U 1,3,4-oxadiazolů byla otestována kromě jejich inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BuChE) také jejich možná antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivita. U 1,2,4-oxadiazolů byla prozatím otestována pouze jejich inhibiční aktivita proti AChE a BuChE.

Celkem bylo syntetizováno dvacet dva látek a výtěžky těchto syntéz byly v rozmezí 21-97 %. Látkou, která měla nejnižší hodnotu IC_{50} pro AChE, byl 2-(3-nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol, konkrétně bylo naměřeno 6,68 μM . Nejnižší IC_{50} pro BuChE bylo naměřeno u látky 5-(3,5-dinitrofenyl)-3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol, a to 45,09 μM . Látka s nejnižší hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro mykobakterie, bakterie i houby byl 2-(2,4-dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol, konkrétně s hodnotami MIC od 2 μM pro mykobakterie, 7,81 μM pro bakterie a 125 μM pro houby, přičemž většina zbývajících sloučenin byla antimikrobiálně neúčinná.

KLÍČOVÁ SLOVA

Acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, butyrylcholinesteráza, hydrazinkarboxamidy, chemická syntéza, inhibice cholinesteráz, oxadiazoly.

ABSTRACT

The topic of this thesis is the synthesis of oxadiazole derivatives and their precursors as potential therapeutics for neurodegenerative diseases, and their evaluation primarily as potential inhibitors of cholinesterases (CHE).

The theoretical part of this thesis focuses on Alzheimer's disease, particularly its pathophysiology, diagnosis, and treatment. It also discusses CHE inhibitors that are already clinically used, as well as new structures with potential for future clinical use. Additionally, it addresses the oxadiazole fragment, its chemical and biological properties.

In the experimental work, derivatives of 1,3,4- and 1,2,4-oxadiazoles were synthesized, which differed not only in the type of oxadiazole but also in their substitution. These substances were prepared by the cyclization of precursors, which were also prepared and tested. For 1,3,4-oxadiazoles, besides their inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), their potential antimycobacterial, antibacterial, and antifungal activities were tested. For 1,2,4-oxadiazoles, so far, only their inhibitory activity against AChE and BuChE has been tested.

A total of twenty-two substances were synthesized, and the yields of these syntheses ranged from 21-97%. The compound with the lowest IC_{50} value for AChE was 2-(3-nitrophenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazole, specifically measured at 6.68 μM . The lowest IC_{50} for BuChE was measured for the compound 5-(3,5-dinitrophenyl)-3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazole, at 45.09 μM . The compound with the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) values for mycobacteria, bacteria, and fungi was 2-(2,4-dinitrophenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazole, with MIC values from 2 μM for mycobacteria, 7.81 μM for bacteria, and 125 μM for fungi, while most of the remaining compounds were antimicrobial inactive.

KEYWORDS

Acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase, hydrazinecarboxamides, chemical synthesis, cholinesterase inhibition, oxadiazoles.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	ALZHEIMEROVA CHOROBA	9
2.1.1	Patofyziologie.....	9
2.1.2	Rizikové faktory a genetika.....	10
2.1.3	Průběh AD	10
2.1.4	Diagnostický postup	10
2.1.5	Terapie AD.....	11
2.2	INHIBITORY CHOLINESTERÁZ	13
2.2.1	Acetylcholinesteráza.....	14
2.2.2	Butyrylcholinesteráza	14
2.2.3	Zástupci klinicky využívaní v terapii AD.....	14
2.2.4	Přírodní inhibitory	16
2.2.5	Analoga takrinu	17
2.2.6	Inhibitory cholinesteráz účinkující na více cílů.....	18
2.3	OXADIAZOLY	19
2.3.1	Chemie oxadiazolů	19
2.3.2	Využití oxadiazolů ve farmacii	19
3	CÍLE PRÁCE	23
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	CHEMIE	24
4.1.1	Obecná metodika	24
4.1.2	Syntéza prekurzorů 1,3,4-oxadiazolů a jejich charakterizace	25
4.1.3	Syntéza 1,3,4-oxadiazolů a jejich charakterizace	37
4.1.4	Syntéza 1,2,4-oxadiazolů a jejich charakterizace	46
4.2	BIOCHEMIE	53

4.2.1	Metodika stanovení inhibiční aktivity AChE a BuChE [39]	53
4.3	BIOLOGIE	54
4.3.1	Metodika hodnocení antimykobakteriální aktivity [40]	54
4.3.2	Metodika hodnocení antibakteriální aktivity [41], [42]	55
4.3.3	Metodika hodnocení antifungální aktivity [41]	56
5	DISKUZE A VÝSLEDKY	57
5.1	CHEMICKÉ HODNOCENÍ	57
5.2	BIOCHEMICKÉ HODNOCENÍ	59
5.3	BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ	61
5.3.1	Antimykobakteriální aktivita	61
5.3.2	Antibakteriální aktivita	63
5.3.3	Antifungální aktivita	64
6	ZÁVĚR	65
7	POUŽITÉ ZDROJE	66
8	SEZNAM ZKRATEK	71
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	73
10	SEZNAM TABULEK	75

1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je velmi závažné a zákeřné onemocnění, které je nejčastější příčinou demence. Ukazuje se, že do roku 2050 se počet lidí, trpících tímto onemocněním, v Evropě zdvojnásobí a celosvětově ztrojnásobí. V aktuální době nemáme žádný kauzální lék, který by dokázal toto onemocnění vyléčit. Proto je důležité lépe poznat základní patologii tohoto onemocnění a hledat kauzální léky modifikující toto onemocnění. Zároveň je důležité zkoumat nové metody diagnostiky, které by zajistily včasné odhalení a léčení AD. [1]

V současné době se v léčbě AD využívají symptomatická léčiva upravující cholinergní systém. Hledají se další struktury, které by svým účinkem mohly překonat aktuálně používané látky. Oxadiazoly se v posledních letech staly předmětem mnoha výzkumů díky svým možným antibakteriálním, antifungálním a antivirovým účinkům a účinkům při léčbě AD. Svůj význam ve farmacii mají především 1,3,4- a 1,2,4-oxadiazoly. [2], [3], [4]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA

AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění spojené s tvorbou amyloidních plaků a neurofibrilárních klubíček v mozku. [5]

2.1.1 Patofyziologie

Ještě před samotným projevem nemoci dochází v preklinické části onemocnění ke změnám v neuronech, mikroglíích a astroglíích. Mezi hlavní patologické znaky spojené právě s AD patří výskyt amyloidních plaků a neurofibrilárních klubíček. Tyto patologické procesy přispívají k neurodegeneraci a následné ztrátě spojení mezi jednotlivými neurony a také k úbytku až k úplné ztrátě neuronů. [1], [6]

Amyloidní plaky, které se kumulují mimo nervovou buňku, jsou především složeny z nerozpustného, abnormálně svinutého beta-amyloidu. Beta-amyloid je peptid, který je složen ze 40, případně 42 aminokyselin. Oba typy jsou produkty metabolismu amyloidového prekursorového proteinu. [6], [7]

Neurofibrilární klubíčka se tvoří uvnitř nervových buněk a tvoří je párové helikální filameny, které se skládají z hyperfosforylovaného tau-proteinu. Fyziologický tau-protein v mozku obsahuje na 1 mol proteinu 2 až 3 moly fosfátu a jeho funkce je stabilizace vazby k mikrotubulům, které se díky němu mohou pojit s dalšími cytoskeletálními komponentami. Změna množství i struktury fyziologického tau-proteinu může vést k destabilizaci mikrotubulů a ke zvýšení množství nenavázaného tau-proteinu a k jeho hyperfosforylaci. Oproti fyziologickému je hyperfosforylovaný tau-protein v mozku lidí trpících AD nejméně třikrát až čtyřikrát více fosforylován. Stupeň fosforylace podpoří rozvláknění proteinu a jeho spojení do již zmíněných párově helikálních filament a má tím pádem vliv na jeho biologickou aktivitu. [6], [7]

Kromě amyloidních plaků a neurofibrilárních klubíček mají vliv na vznik AD také zánětlivé procesy v mozku, změny v cévách, stárnutí a dysfunkce glymfatického systému, jehož úkolem je odstraňovat odpadní látky z mozku. [1]

Zásadní vliv na patofyziologické procesy při AD má také oxidační stres, který vzniká nerovnováhou mezi produkcí reaktivních kyslíkových radikálů a schopností antioxidačních obranných mechanismů. Vůči oxidačnímu stresu jsou citlivé mozkové membránové fosfolipidy

složené z nenasycených mastných kyselin, ale také proteiny. Oxidační stres tak může ovlivnit enzymy, které jsou důležité pro funkce neuronů a glií. [8]

2.1.2 Rizikové faktory a genetika

Mezi hlavní rizikové faktory, které mohou přispět k AD, patří pokročilý věk (osoby starší než 65 let), ženské pohlaví, nezdravý životní styl a kardiovaskulární rizikové faktory. Při studii na dvojčatech bylo zjištěno, že riziko AD je z 60-80 % závislá na dědičných faktorech. Jako druhý nejdůležitější rizikový faktor pro AD je přítomnost alely pro apolipoprotein E4 (ApoE4). U lidí nesoucích jednu alelu pro ApoE4 je riziko vzniku AD 29 % a u lidí, kteří nesou obě alely, je riziko 83 %. [1], [7], [9]

Mezi další rizikové faktory patří nižší stupeň dosaženého vzdělání v mladém věku, úrazy hlavy v minulosti nebo také perinatální faktory, mezi které patří například porodní váha a prenatální výživa. Vliv na vznik AD mají také faktory ovlivňující vývoj mozku v raném věku, jako jsou růst hlavy a výživa. [7], [10]

2.1.3 Průběh AD

Průběh AD se dá rozdělit do čtyř stadií. V průběhu prvního stadia, které je asymptomatické, dochází k nárůstu množství amyloidu v mozku. První klinické projevy se začínají objevovat ve druhém, tzv. lehkém stadiu onemocnění, ke kterému dochází přibližně po deseti letech od začátku onemocnění. Projevuje se to mírnými poruchami kognitivních funkcí. Nemocní jsou si vědomi počínajících výpadků paměti a dochází k narušení některých složitějších činností. [7], [11]

Po asi čtyřech letech dochází k progresi na třetí, středně těžké stadium. V průběhu tohoto stadia dochází k významné ztrátě soběstačnosti a je potřeba trvalý dohled nad nemocným. [7], [11]

Po přibližně třech letech dochází k poslednímu, těžkému stadiu nemoci, kdy nemocný nepoznává své nejbližší a ztrácí schopnost komunikovat. Kvůli vzniklé ztrátě pohyblivosti a inkontinenci je již potřeba trvalá komplexní ošetrovatelská péče. Toto stadium trvá obvykle tři roky. Jedná se o poslední stadium, které končí smrtí pacienta. [7], [11]

2.1.4 Diagnostický postup

Časná diagnostika může významně zpomalit progresi AD, a tím i oddálit pokročilejší stadia. I proto by se mělo stát orientační vyšetření kognitivních funkcí součástí všeobecné preventivní prohlídky u lidí starších 65 let a lidí s rizikovými faktory. [11]

Při vyšetření kognitivních funkcí u praktického lékaře by měl být proveden nejprve tzv. MiniCOG test. Tento test se skládá ze 3 kroků. V prvním i třetím kroku je požadováno po pacientovi, aby zopakoval tři slova, které mu jsou řečeny na začátku testu v průběhu kroku jedna. Během kroku dva je pacient požádán, aby nakreslil hodiny na list s přednakresleným kruhem. Podle úspěšnosti je pacient za každý krok obodován, a pokud získá méně než 3 body, je potřeba přejít na MMSE (Mini Mental State Exam) test. [11]

MMSE test se skládá z pěti oblastí, kdy každá testuje jinou kognitivní schopnost. Oblasti testují orientaci, paměť, pozornost a počítání, krátkodobou paměť a jako poslední řeč, komunikaci a konstrukční schopnosti. Každá oblast je příslušně obodována a pacient po tomto testu získá bodové ohodnocení, které odráží jeho kognitivní funkce. Podle bodů test pacienty dělí na pacienty s lehkou, středně těžkou nebo těžkou kognitivní poruchou, případně na pacienty v pásmu normálu. [11]

Pokud pacientovi MMSE test vyjde pozitivně (tzn. získá méně než 24 bodů, tedy lehká kognitivní porucha), tak je žádoucí nejdříve vyloučit sekundární poruchu pomocí např. laboratorního vyšetření krve, elektrokardiogramu a Holteru. Pokud výsledky vyloučí sekundární příčinu, je potřeba poslat pacienta k neurologovi, geriatrovi nebo psychiatrovi k došetření a případnému zavedení terapie. [11]

V poslední době má větší význam v diagnostice AD také elektroencefalogram (EEG). Jedná se o nákladově efektivní a neinvazivní přístroj, který slouží ke sledování elektrické aktivity neuronů. Sledování EEG signálů napomáhá rozpoznat, sledovat a predikovat průběh AD. [12]

2.1.5 Terapie AD

V současné chvíli neexistuje žádná v praxi využívaná kauzální léčba na AD. Cílem terapie je zpomalit progresi a prodloužit soběstačnost pacienta, tím i oddálit nutnost trvalé komplexní ošetrovatelské péče, která se pojí se změnou prostředí, a tím i se vznikem adaptačního syndromu a s významným zhoršením pacientova stavu. [7], [11]

Při terapii AD je využívána kombinace nefarmakologických a farmakologických přístupů. V rámci nefarmakologické léčby jsou užívány rehabilitační programy, jejichž cílem je cvičit kognitivní i nekognitivní funkce pacientů. U pečující rodiny je pak velmi důležitý přístup k nemocnému. Pečující rodina by měla být dostatečně trpělivá a snažit se co nejdéle zapojovat nemocného do chodu domácnosti. [7]

Farmakologická léčba by se dala rozdělit na tři kategorie: na léčbu zlepšující kognitivní funkce u AD, na léčbu doprovodných příznaků demence a na terapii modifikující průběh AD, která je v současné chvíli hlavním předmětem výzkumu. [1], [11]

K léčbě kognitivních funkcí se používají dvě skupiny léčiv. První skupinou jsou inhibitory CHE, které působí na průběhem nemoci poškozený acetylcholinergní systém. Ten je potřebný pro správné fungování mechanismů paměti i dalších kognitivních funkcí a chování. Tyto blokátory jsou indikovány pro lehká až středně těžká stadia demence dle MMSE. V praxi se z této skupiny používá donepezil, rivastigmin a galantamin. Více budou rozebrány v kapitole 2.2. Do druhé skupiny patří antagonisté *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů, které zasahují do glutamátového přenosu v centrálním nervovém systému. Z této skupiny má v praxi využití memantin, který je nekompetitivní antagonistou NMDA receptoru a je indikován k léčbě středně těžké až těžké formy demence dle MMSE. [7], [11]

Mezi látky, které pozitivně ovlivňují metabolismus centrální nervové soustavy a které mohou být podávány během AD, patří extrakt *Ginkgo biloba* EGb 761 a cerebrolysin. Tyto látky patří do skupiny nootropních farmak, jejichž úkolem je podpořit kognitivní funkce pacienta. Tyto látky prokázaly pozitivní vliv na kognitivní poruchy u lehké a středně těžké AD. Jejich přesný mechanismus účinku není znám. [13], [14], [15]

Extrakt z *Ginkgo biloba* obsahuje směs aktivních látek, mezi které patří flavonoidy, terpenové laktony, jejichž součástí jsou bilobalidy a ginkgolidy A, B, a C, dále jsou zde obsaženy organické kyseliny a proanthokyanidiny. Extrakt má upravený obsah toxické kyseliny ginkgolidové, které je v extraktu obsaženo méně než 5 ppm. Extrakt je používán pro svoje antioxidační a neuroprotektivní účinky. Také slabě inhibuje acetylcholinesterázu (AChE), čímž napomáhá cholinergnímu přenosu v mozku. [13], [14]

Cerebrolysin je směs aminokyselin a neuropeptidů ve vodném prostředí, která vznikla hydrolyzou vepřových mozků. Podává se parenterálně a působí jako endogenní nervové růstové faktory, které mají vliv na vznik, růst, diferenciaci a také přežití neuronů. Zásadně ovlivňují tedy prakticky všechny funkce v mozku. Klinické studie ukazují, že podávání cerebrolysinu přispívá k oddálení nástupu a progresu AD. [13], [15]

Jako doprovodné příznaky se u AD objevují úzkostné stavy, deprese, poruchy spánku, psychotické poruchy a poruchy osobnosti a chování. Psychotické projevy se léčí za pomoci antipsychotik. Podávají se neuroleptika druhé generace, např. tiaprid, risperidon nebo

olanzapin. Při léčbě depresí se postupuje stejně jako u starších pacientů bez organického mozkového onemocnění, ale je potřeba vyvarovat se lékům se sedativním a anticholinergním působením, které by mohly zhoršit kognitivní funkce. Při spánkových poruchách je možné podat melatonin. [7], [11], [16]

Jak již bylo uvedeno, v poslední době je většina vývoje léků na AD soustředěna na hledání léčby, která by modifikovala toto onemocnění. Výzkumy často cílí na beta-amyloid a vytváření amyloidních plaků, jejichž množství se snaží snížit pomocí např. monoklonálních protilátek. Ve vývoji jsou také vakcíny proti beta-amyloidu. Dále jsou ve výzkumu látky cílicí na tau protein, například monoklonální protilátky interagující s extracelulárním tau proteinem nebo malé molekuly, které cílí na jeho agregaci a tvorbu neurofibrilárních klubíček. Dále jsou zkoumány léky cílicí na zánětlivé procesy v mozku a na infekce způsobené viry nebo bakteriemi. [1]

Monoklonální protilátky adukanumab a lekanemab byly schváleny Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv). Adukanumab byl schválen pro léčbu prodromální fáze a lehké demence u AD a lekanemab pro léčbu lehké kognitivní poruchy a lehké demence u AD. Obě protilátky získaly urychlené schválení ve zrychleném schvalovacím procesu. [17]

Adukanumab je imunoglobulin G1 (IgG1), lidská protilátka, která cílí na amyloidní plaky, které pomáhá redukovat. Účinkuje navázáním se na N-konec beta-amyloidu a specificky tak působí na jeho rozpustné i nerozpustné agregáty. Kromě redukce amyloidních plaků vykazuje také neuroprotektivní účinek. [1], [17], [18]

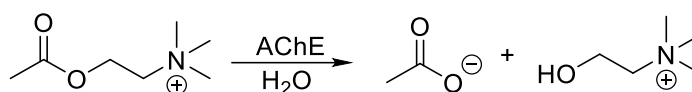
V případě lekanemabu se jedná o IgG1, humanizovanou protilátku, která také působí na amyloidní plaky. Konkrétně cílí přednostně na rozpustné agregáty beta-amyloidu. Nejvyšší pokles beta-amyloidu byl zaznamenán, při užívání dávky 10 mg/kg jednou za dva týdny. [17], [18]

2.2 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ

Inhibitory cholinesteráz (CHE) lze rozdělit na dvě skupiny: na inhibitory AChE a butyrylcholinesterázy (BuChE). Obě skupiny blokují enzym, který odbourává acetylcholin (ACh), čímž dochází ke zvýšení koncentrace ACh v synapsích a k následnému zlepšení acetylcholinergní transmise. [7], [19]

2.2.1 Acetylcholinesteráza

AChE je klíčový enzym cholinergního nervového systému, jehož úkolem je katalýza hydrolyzy ACh na cholin a acetát (Obr. 1). Aktivní místo AChE je velká hydrofobní dutina a skládá se ze dvou míst, aniontového a esterázového. Esterázové místo obsahuje katalytickou triádu, která se skládá ze třech aminokyselin (serin, glutamová kyselina a histidin), které jsou potřebné pro katalytickou aktivitu enzymu. Aniontové místo interaguje s kladně nabitou kvartérní amoniovou skupinou cholinové části ACh. Zároveň AChE obsahuje periferní aniontové místo (PAS), které je odlišné od aniontového místa vázajícího cholin v aktivním místě. Do tohoto místa se ACh váže jako první krok v katalytické dráze, to má vliv na rychlost hydrolyzy. [19], [20], [21]



Obrázek 1 Hydrolyza acetylcholinu

2.2.2 Butyrylcholinesteráza

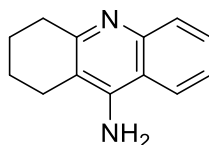
BuChE je pseudocholinesteráza nacházející se v centrálním i periferním nervovém systému, ale také například v játrech. Přestože může být ACh rozkládán jak AChE, tak BuChE, za normálních podmínek je rozkládán primárně pomocí AChE a BuChE má tak vedlejší roli v regulaci jeho hladiny v mozku. Při progresi AD se však hladina BuChE zvyšuje na 120 % fyziologických hodnot, což značí, že se v pozdních fázích AD zvyšuje její význam při hydrolyze ACh. [22], [23]

Struktura BuChE je velmi podobná struktuře AChE. Obě struktury obsahují téměř 65 % homologních aminokyselinových sekvencí a obě mají aromatické hrdlo, PAS a katalytické aktivní místo, které leží na dně hluboké kavity. V případě AChE do aromatického hrdla vyčnívají aromatické části AMK, tím zabírají prostor a způsobují vyšší selektivitu pro malé molekuly. BuChE má v tomto prostoru menší zbytky AMK, což umožňuje navázání větších substrátů a díky tomu je možné navrhnout její selektivní inhibitory. [22]

2.2.3 Zástupci klinicky využívání v terapii AD

Mezi inhibitory CHE, které jsou v současnosti schváleny regulačními orgány pro léčbu kognitivního deficitu při AD, patří donepezil, rivastigmin a galantamin. Jako první z inhibitorů CHE byl pro léčbu AD schválen v roce 1993 takrin (Obr. 2). Od jeho používání však bylo

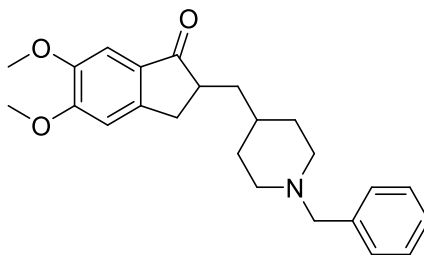
upuštěno kvůli velkému množství nežádoucích účinků, mezi které patří kromě průjmu, nevolnosti a zvracení také hepatotoxicita. [20], [23]



Obrázek 2 Struktura takrinu

2.2.3.1 Donepezil

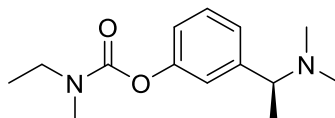
Donepezil (Obr. 3) je reverzibilní inhibitor s vysokou selektivitou pro AChE ve srovnání s BuChE. Jeho účinek spočívá v interakci s PAS. Neinteraguje tedy přímo s katalytickou triádou. Působí nejen inhibicí CHE, ale také má vliv na snížení exprese zánětlivých cytokinů a snížení účinků vyvolaných oxidačním stresem. Má také kauzální účinky, neboť zpomaluje ukládání amyloidního plaku. Využívá se při léčbě lehké až středně těžké AD. Na začátku léčby je podáván v denní dávce 5 mg. Ta může být následně navýšena na 10 mg za den, což je dávka, která v klinických studiích přinášela největší výhody. Z důvodu jeho dlouhého biologického poločasu, který je přibližně 70 hodin, je možné ho užívat jedenkrát denně. [19], [20], [23]



Obrázek 3 Struktura donepezilu

2.2.3.2 Rivastigmin

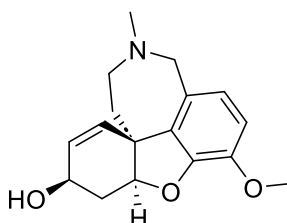
Rivastigmin (Obr. 4) je silný, reversibilní karbamátový inhibitor jak AChE, tak BuChE. Účinkuje pomocí interakce karbamátové části s esterázovým místem v aktivním místě enzymu. Karbamátová část interaguje s enzymem snáze než acetylová část ACh, čímž je jeho hydrolyza zpomalena. Používá se k léčbě lehké až středně těžké AD. Je podáván v počáteční denní dávce 3 mg. Tuto dávku lze navýšit až na čtyřnásobek. [19], [20], [23]



Obrázek 4 Struktura rivastigminu

2.2.3.3 Galantamin

Galantamin (Obr. 5) je kompetitivní, rychlý reversibilní inhibitor selektivní pro AChE. Jedná se o alkaloid izolovaný z cibulí rostliny *Galanthus woronowii*. Jeho účinek spočívá v interakci s aniontovým místem aktivního místa AChE. Kromě interakcí s AChE funguje také jako alosterický ligand na nikotinových receptorech. Je využíván k léčbě lehké až středně těžké AD. Obvykle je podáván v denní dávce 16 až 24 mg za den. [19], [20], [23]

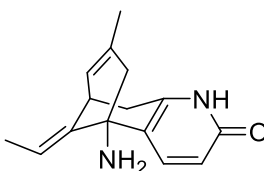


Obrázek 5 Struktura galantaminu

2.2.4 Přírodní inhibitory

2.2.4.1 Huperzin A

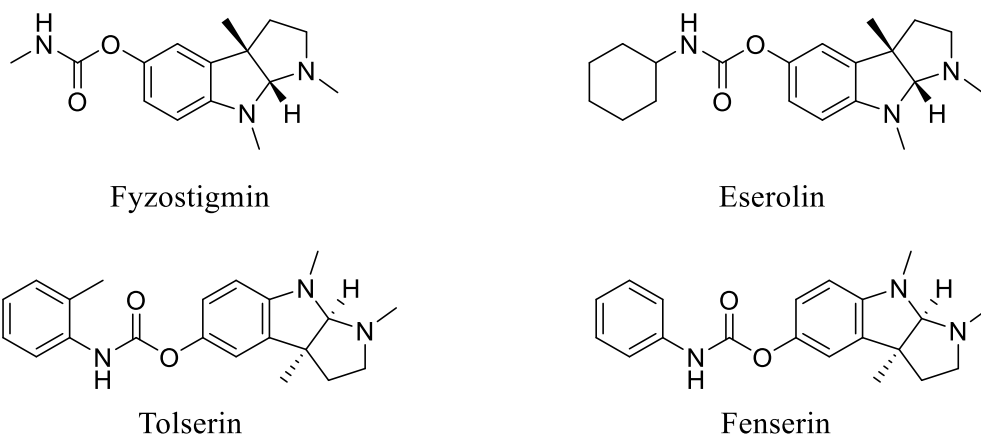
Huperzin A (Obr. 6) je alkaloid, který je získáván extrakcí z rostliny *Huperzia serrata*. Jedná se o reversibilní inhibitor AChE. V porovnání s jinými inhibitory AChE prochází snáze skrz hematoencefalickou bariéru, což zvyšuje jeho biologickou dostupnost. Klinické testy ukázaly jeho pozitivní vliv při léčbě kognitivního deficitu při AD. [19], [23]



Obrázek 6 Struktura huperzinu A

2.2.4.2 Deriváty fyzostigminu

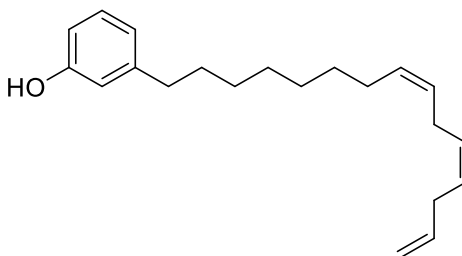
Fyzostigmin (Obr. 7) je sekundární metabolit rostliny *Physostigma venenosum*. Nepoužívá se v terapii z důvodu krátkého poločasu rozpadu a velkého počtu nežádoucích účinků. Mezi jeho deriváty patří tolserin, eserolin a fenserin (Obr. 7). Klinicky testován byl pouze fenserin. Jedná se o nekompetitivní, selektivní inhibitor AChE. Kromě jeho působení na cholinergní systém, působí také jako inhibitor agregace beta-amyloidu. Díky tomu se jedná o látku, která působí na více cílů. Klinické testy prokázaly jeho možný účinek při léčbě symptomů AD. [19], [20], [23]



Obrázek 7 Struktura fyzostigminu a jeho derivátů

2.2.4.3 Kardanolové deriváty

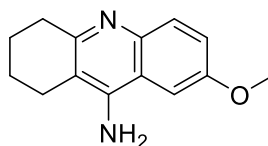
Kardanolové deriváty vznikají přidáním funkčních skupin na sloučeninu kardanol. Jeden z příkladů jejich struktury lze vidět na Obr. 8. Kardanol je neisoprenoidní fenolický lipid, který je obsažen v rostlině *Anacardium orientale*. Mezi funkční skupiny, které lze použít ke zvýšení účinku kardanolu, patří acetyl, methyl a *N,N*-dimethylkarbamoyl, které se vážou na fenolickou skupinu, a dále také piperidin, pyrrolidin, *N,N*-dimethylbenzylamin, *N,N*-dimethylamin a *N,N*-diethylamin, které se vážou na α uhlík alifatického řetězce vůči aromatickému jádru. Takto vzniklé deriváty jsou potenciální sloučeniny pro testování jejich účinku při léčbě AD díky jejich inhibici AChE. [19], [24]



Obrázek 8 Příklad struktury kardanolu

2.2.5 Analoga takrinu

Z důvodu hepatotoxického účinku takrinu byla snaha syntetizovat jeho derivát s nižší toxicitou. To se povedlo syntézou 7-methoxytakrinu (Obr. 9), který je silným inhibítozem aniontového aktivního místa AChE a který vykazuje nižší toxicitu a vyšší inhibiční schopnost než takrin. Od něj byly vytvořeny další deriváty pomocí alkylace primární aminoskupiny. [20], [25]



Obrázek 9 Struktura 7-methoxytakrinu

2.2.6 Inhibitory cholinesteráz účinkující na více cílů

V poslední době se začínají syntetizovat sloučeniny, které by kromě inhibice AChE mohly působit také na jiné cíle při léčbě AD. [19]

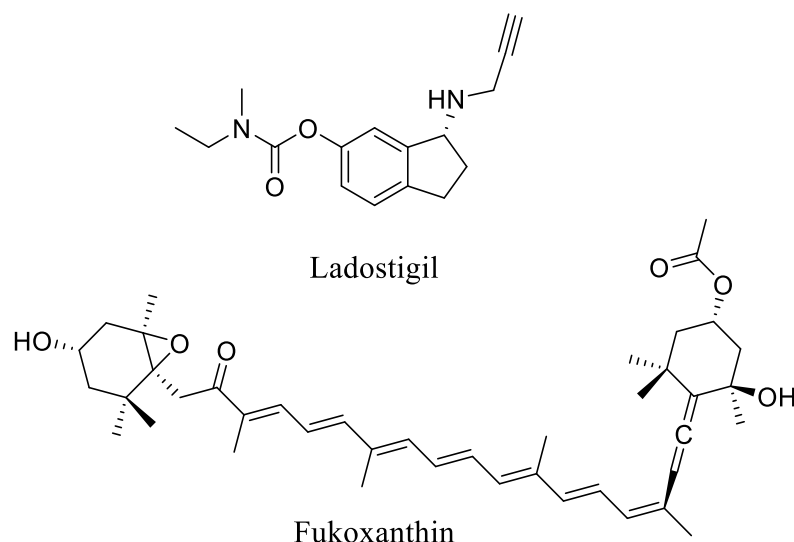
Mezi takovéto látky patří ladostigil (Obr. 10), který kromě inhibice ChE inhibuje také monoaminoxidázu A a B (MAO-A/B) a má antioxidační účinky. Je to hybrid rivastigminu a rasagilinu. Dále jsou vyvíjeny také tzv. hybridní molekulární struktury, jejichž cílem je působit na více míst AChE nebo inhibovat agregaci beta-amyloidu. Příkladem toho je hybrid založený na kombinaci donepezilu a takrinu, který inhibuje AChE, BuChE i agregaci beta-amyloidu. [19]

Další skupina látek, která působí na více cílů AD, jsou flavonoidy. Flavonoidy jsou přírodní látky získávané z rostlin, které mají schopnost pohlcovat volné radikály. Příkladem je látka galangin, která byla získána z oddenků rostliny *Alpiniae officinarum*. [19]

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2.4.2 do této skupiny látek patří také fenserin. [19]

Dále byly zkoumány metabolity z mořských řas díky jejich neuroprotektivním, protizánětlivým a antioxidačním vlastnostem. Příkladem metabolitů řas, které jsou schopny inhibovat CHE, je fukoxanthin (Obr. 10). Jedná se o karotenoid, který se nekompetitivně váže na aniontové místo AChE. [19]

Jako poslední skupinu zde uvedu chalkonové deriváty, jejichž klíčovou strukturu tvoří právě chalkonové uskupení. Příkladem je liquiritigenin, který byl izolován z rostliny *Glycyrrhizae uralensis*, a je již užíván k léčbě kašle a pro detoxikaci. Bylo zjištěno, že by mohl mít vliv na zlepšení kognitivních schopností díky inhibici AChE a MAO a regulaci volných radikálů. [19]

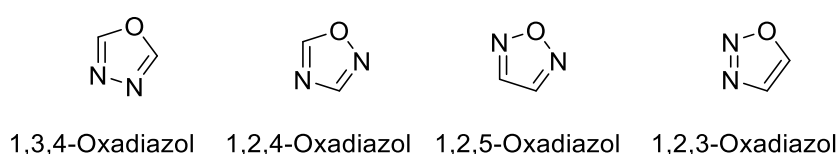


Obrázek 10 Struktura ladostigilu a fukoxanthinu

2.3 OXADIAZOLY

2.3.1 Chemie oxadiazolů

Oxadiazoly jsou sloučeniny složené z pětičlenného heterocyklického kruhu, který obsahuje jeden atom kyslíku a dva atomy dusíku. Tyto heteroatomy mohou být odlišně uspořádány, a tím vytváří rozdílné izomerní formy oxadiazolů. Tři izomerní struktury oxadiazolů jsou termodynamicky stabilní: 1,3,4-oxadiazoly, 1,2,4-oxadiazoly a 1,2,5-oxadiazoly. 1,2,3-Oxadiazoly jsou díky přítomnosti otevřeného kruhu v jejich tautomeru velmi nestabilní. Jejich struktury lze vidět na Obr. 11. [4]



Obrázek 11 Izomerní struktury oxadiazolů

Reaktivita oxadiazolů je závislá na jejich aromaticitě. Nižší aromaticita znamená nižší odolnost vůči přesmyku kruhu, jako je tomu u 1,2,4-oxadiazolů. 1,2,5-Oxadiazolový kruh je náchylný k jeho rozštěpení, k čemuž dochází v přítomnosti NaOH ve vodném roztoku. Nejvyšší stabilitu vykazují 1,3,4-oxadiazoly. [4]

2.3.2 Využití oxadiazolů ve farmacii

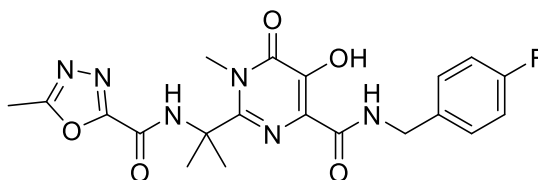
Jak již bylo psáno v úvodu, svůj význam ve farmacii mají především sloučeniny odvozené od 1,3,4- a 1,2,4-oxadiazolů. Deriváty 1,2,5-oxadiazolu se díky své vysoké energetické hustotě

staly perspektivními materiály při výrobě vysokoenergetických a výbušných látek, které jsou ekologicky nezávadné. [3], [4], [26]

2.3.2.1 1,3,4-oxadiazoly

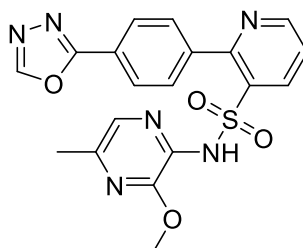
Deriváty 1,3,4-oxadiazolu jsou látky studované ve farmacii, díky svému antibakteriálnímu, antivirovému, antifungálnímu, protizánětlivému, protirakovinovému účinku a také díky schopnosti snížit krevní tlak. Zároveň jsou předmětem výzkumu jejich antimykobakteriální účinky. [4], [27]

Příkladem schválené a uznávané látky s 1,3,4-oxadiazolovým fragmentem je raltegravir (Obr. 12). Jedná se o léčivou látku využívanou jako primární lék při léčbě HIV. Jeho účinek spočívá v inhibici enzymu integráza, která napomáhá začlenit virový genetický materiál do lidského chromozomu. Napomáhá tak snížit šíření viru v lidském těle. [4]



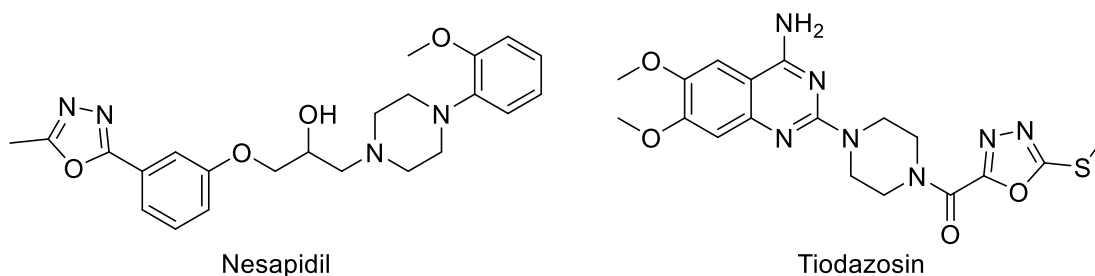
Obrázek 12 Struktura raltegraviru

Dalším příkladem látky obsahující 1,3,4-oxadiazolový fragment je látka zibotentan (Obr. 13). Jedná se o testovanou sloučeninu pro její protirakovinovou aktivitu a pro její možné využití při léčbě těžkých nádorů prostaty, rakoviny vaječníků a prsu. [4]



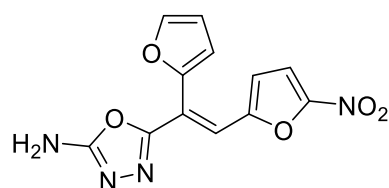
Obrázek 13 Struktura zibotentanu

Mezi látky známé pro svůj účinek v kardiovaskulárním systému patří nesapidil a tiodazosin (Obr. 14). Nesapidil je blokátor vápníkových kanálů, díky čemuž ovlivňuje koronární vazokonstrikci, a tím má vliv na celkový průtok krve, zároveň zpomaluje AV vedení vzruchu, díky tomu má své antiarytmické působení. Sloučenina tiodazosin blokuje adrenergní aktivitu (selektivní α_1 blokátor), což způsobuje její antihypertenzní aktivitu. [4], [28]



Obrázek 14 Struktury nesapidilu a tiodazosinu

Posledním příkladem sloučeniny s 1,3,4-oxadiazolovým fragmentem je furamizol (Obr. 15). Jedná se o látku odvozenou kromě 1,3,4-oxadiazolu také od nitrofuranu. Je to látka se silnou antibakteriální aktivitou. [4], [28]

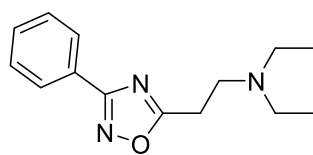


Obrázek 15 Struktura furamizolu

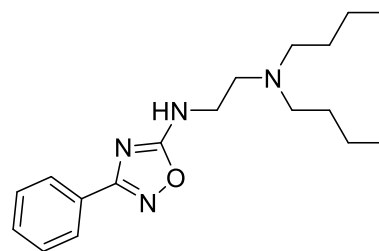
Mimo své využití ve farmacii jsou jejich deriváty využívány také v zemědělství pro svůj antibakteriální, fungicidní, herbicidní a insekticidní účinek. [4]

2.3.2.2 1,2,4-oxadiazoly

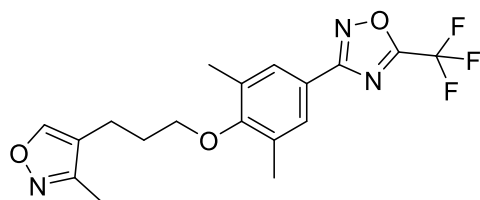
V dnešní době je již používáno několik komerčně dostupných látek, které obsahují 1,2,4-oxadiazolový fragment. Mezi ně patří léčiva s protizánětlivým, protiinfekčním nebo vasodilatačním účinkem, nebo také molekuly, které se využívají k tlumení kašle nebo při léčbě svalové dystrofie. Dále jsou sloučeniny 1,2,4-oxadiazolu spojené s protirakovinovým, analgetickým a antioxidačním účinkem. Také jsou studovány jako látky účinné proti AD a tuberkulóze. První komerční léčivo obsahující 1,2,4-oxadiazolový fragment, které bylo uvedeno na trh, byl oxolamin, který byl předepisován na tlumení kašle. Další užívané látky s tímto fragmentem jsou např. butalamin (vasodilatátor), plekonaril (antivirotikum), ataluren (lék na léčbu svalové dystrofie) nebo fasiplon (anxiolytikum) (Obr. 16). [3], [29]



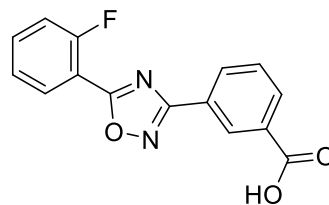
Oxolamin



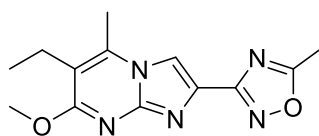
Butalamin



Plekonaril



Ataluren



Fasiplon

Obrázek 16 Struktury oxolaminu, butalaminu, plekonarilu, atalurenu a fasiplonu

Deriváty 1,2,4-oxadiazolů se kromě léčiv používají také jako scintilační materiály a v průmyslu barviv. [3]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIE

4.1.1 Obecná metodika

Všechny chemikálie, které byly při syntézách použity, byly zakoupené od firem Merck (Darmstadt, Německo), VWR/Avantor (Stříbrná Skalice, Česká republika), Apollo Scientific Ltd (Stockport, Velká Británie), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a byly použity bez dalších úprav.

Průběhy reakcí byly monitorovány a retenční faktory (R_f) připravených sloučenin byly zjištěny pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze, která byla zakoupená od firmy Merck Millipore (Darmstadt, Německo), byly použity destičky potažené 0,2mm vrstvou silikagelu Merck 60 F254. Jako mobilní fáze (MF) pro TLC i pro kolonovou chromatografii byla použita směs dichlormethanu (DCM) a MeOH v objemových poměrech 93:7 pro *N'*-acylnikotinohydrazidy, *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidy a pro amidoximy a 97:3 pro 1,3,4- i 1,2,4-oxadiazoly. Jako stacionární fáze pro kolonovou chromatografii byl použit silikagel Merck Kieselgel 60 Å (0.040-0.063 mm), který byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Struktura všech připravených sloučenin byla potvrzená pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR), kdy bylo změřeno vodíkové i uhlíkové spektrum. NMR spektra byla naměřena při laboratorní teplotě anebo při teplotě 60 °C v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO- d_6) na přístrojích Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 126 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA) a JEOL JNM-ECZ 600R (600 MHz pro ^1H a 151 MHz pro ^{13}C ; JEOL, Tokio, Japonsko). Měření bylo prováděno na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. Hodnoty chemických posunů (δ) jsou vyjádřeny v partes per million (ppm) a v protonových spektrech jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu, v uhlíkových spektrech byly určeny podle centrální linie rozpouštědla (DMSO- d_6 při $\delta = 39,5$ ppm). Hodnoty interakčních konstant (J) jsou vyjádřeny v Hz. Vyhodnocení NMR spekter bylo provedeno pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Teploty tání byly naměřeny pomocí otevřené skleněné kapiláry, vložené do přístroje Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švýcarsko). Výsledné hodnoty jsou vyjádřené jako interval a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla naměřena na spektrofotometru Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření bylo provedeno technikou ATR (attenuated total reflectance) na germaniovém krystalu. Všechna spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové paní Ivou Vencovskou. Uvedené hodnoty vlnočtů jsou v cm^{-1} .

Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Vypočtené i změřené hodnoty jsou uvedeny v procentech.

Chemické vzorce, reakční schémata a chemické názvy byly vytvořeny a následně zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Tento program byl také použit pro výpočet očekávaných výsledků elementární analýzy.

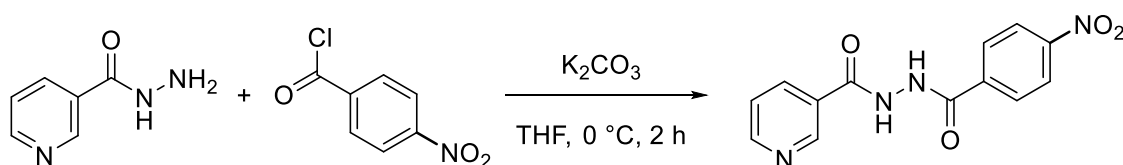
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

4.1.2 Syntéza prekurzorů 1,3,4-oxadiazolů a jejich charakterizace

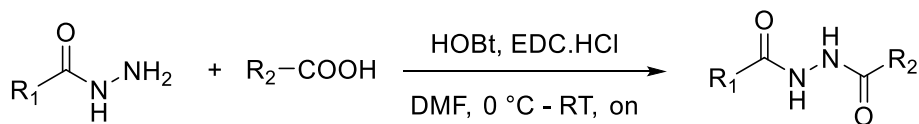
4.1.2.1 Syntéza *N'*-acylnikotinohydrazidů

Syntéza probíhala pomocí dvou metod (Obr. 18).

Metoda 1



Metoda 2



Obrázek 18 Metoda 1 – Schéma přípravy sloučeniny EF01, THF – tetrahydrofuran; Metoda 2 – Schéma přípravy sloučenin EF03, EF04, EF05; HOBT – 1-hydroxybenzotriazol hydrát; EDC.HCl – *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid; DMF – *N,N*-dimethylformamid; on – over night (přes noc)

4.1.2.1.1 Metoda 1 (EF01)

1 mmol nikotinohydrazidu (137 mg) byl suspendován s 2 ekvivalenty uhličitanu draselného (2 mmol, 276 mg) v 15 ml bezvodého tetrahydrofuranu (THF). Směs byla míchána za

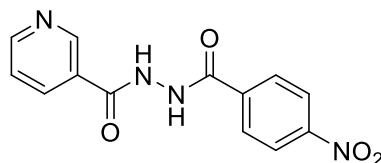
současného chlazení na 0 °C v ledové lázni, poté byl do ní postupně přidán 1,1 ekvivalentu 4-nitrobenzoylchloridu (1,1 mmol, 204 mg). Reakční směs byla ponechána reagovat do přijatelné konverze (indikace pomocí TLC) a po dvou hodinách byl THF odpařen na rotační vakuové odparce (RVO). Po odpaření byl produkt rozpuštěn v demineralizované vodě, jehož pH bylo upraveno pomocí přidání 0,5 M kyseliny chlorovodíkové na hodnotu přibližně 6. Byla provedena extrakce pomocí ethyl-acetátu. Po prvním protřepání došlo k vysrážení produktu v organické vrstvě. Následně byla vodní fáze odpuštěna a ethyl-acetátová frakce byla přefiltrována a výsledný produkt byl vysušen proudem vzduchu.

4.1.2.1.2 Metoda 2 (EF03, EF04, EF05)

2 mmoly příslušné karboxylové kyseliny, 1 ekvivalent příslušného hydrazidu (2 mmol) a 1,1 ekvivalentu 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (HOBt; 2,2 mmol, 297 mg) byly společně suspendovány ve 20 ml *N,N*-dimethylformamidu. Za současného míchání byla reakční směs ochlazená na 0 °C v ledové lázni. Do takto ochlazené směsi bylo přidáno 1,3 ekvivalentu *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu (2,6 mmol, 498 mg). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC a po přijatelné konverzi byla směs odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu a společně s demineralizovanou vodou převeden do dělicí nálevky. Další zpracování se lišilo podle konkrétní látky.

V případě EF03 a EF05 došlo po prvním protřepání k vysrážení produktu v organické fázi, a proto byla vodní fáze odpuštěna a organická fáze byla přefiltrována. Produkt byl vysušen proudem vzduchu a v případě potřeby (EF05) byla provedena rekrystalizace pomocí směsi hexan:ethyl-acetát. V případě EF04 k vysrážení nedošlo. Byla provedena extrakce, a poté byla ethyl-acetátová vrstva vysušena pomocí síranu sodného. Krystalizace produktu byla vyvolána zahuštěním ethyl-acetátové vrstvy na RVO. Výsledná suspenze byla odfiltrována a produkt byl vysušen proudem vzduchu.

4.1.2.1.3 Charakterizace *N'*-acylnikotinohydrazidů *N'*-(4-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF01)



Obrázek 19 *N'*-(4-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF01)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	286,25
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	76 %
Teplota tání:	275,5-277,0 °C (260,5-261 °C)[30]
R _f :	0,37

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.93 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 10.83 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 9.06 – 9.04 (m, 1H), 8.75 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.38 – 8.32 (m, 2H), 8.24 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1H), 8.15 – 8.09 (m, 2H), 7.55 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.95, 164.86, 153.18, 150.03, 148.98, 138.52, 135.81, 129.56, 128.58, 124.35, 124.29.

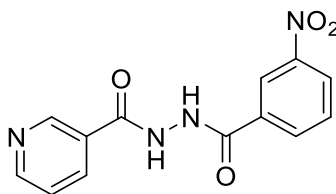
IR (ATR): 3203, 3036, 1704, 1698, 1660, 1610, 1588, 1508, 1487, 1463, 1418, 1350, 1287, 1191, 1105, 1026, 1014, 873, 833, 825, 768, 718, 702, 675, 663, 659, 642, 629, 623, 603 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 54.55; H, 3.52; N, 19.57

nalezeno C, 54.63; H, 3.41; N, 19.52

N'-(3-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF03) [31]



Obrázek 20 *N'*-(3-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF03)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	286,25
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	86 %
Teplota tání:	216,1-218,7 °C
R _f :	0,35

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.99 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 9.06 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.77 – 8.74 (m, 1H), 8.72 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.45 – 8.40 (m, 1H), 8.33 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 8.24 (dt, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.98, 164.38, 153.18, 149.00, 148.42, 135.82, 134.36, 134.26, 131.05, 128.58, 127.16, 124.28, 122.77.

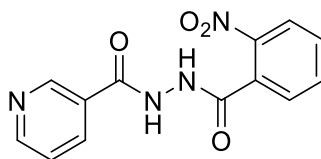
IR (ATR): 3207, 2974, 2704, 1641, 1620, 1598, 1577, 1568, 1521, 1540, 1494, 1460, 1420, 1348, 1285, 1267, 1190, 1142, 1101, 1079, 1025, 1001, 968, 911, 880, 824, 725, 716, 702, 671, 656, 640, 621 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 54.55; H, 3.52; N, 19.57

nalezeno C, 54.62; H, 3.47; N, 19.66

N'-(2-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF04)



Obrázek 21 *N*'-(2-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF04)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	286,25
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	51 %
Teplota tání:	193,1-196,5 °C
R _f :	0,33

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.92 (s, 1H), 10.75 (s, 1H), 9.05 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.25 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 7.85 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 7.76 – 7.72 (m, 2H), 7.55 – 7.52 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.31, 164.79, 153.12, 149.10, 147.80, 135.85, 134.31, 132.14, 130.77, 130.12, 128.48, 124.91, 124.20.

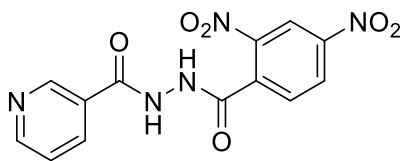
IR (ATR): 3239, 3002, 2868, 1699, 1650, 1614, 1592, 1524, 1474, 1417, 1349, 1325, 1290, 1261, 1193, 1121, 1084, 1040 1029, 993, 967, 911, 856, 796, 760, 743, 702, 668, 655, 630 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 54.55; H, 3.52; N, 19.57

nalezeno C, 54.64; H, 3.47; N, 19.51

N'-(2,4-Dinitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF05)



Obrázek 22 *N'*-(2,4-Dinitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF05)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₉ N ₅ O ₆
Relativní molekulová hmotnost:	331,24
Popis:	Lehce narůžovělá krystalická látka
Výtěžek:	42 %
Teplota tání:	231,4-233,1 °C
R _f :	0,33

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.03 (s, 2H), 9.05 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.76 – 8.74 (m, 1H), 8.67 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 8.25 (dt, *J* = 7.9, 2.0 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.48, 163.47, 153.30, 148.87, 148.15, 135.04, 133.41, 131.89, 127.11, 125.24, 124.90, 121.85, 120.28.

IR (ATR): 3234, 3102, 3063, 1688, 1654, 1615, 1598, 1532, 1420, 1398, 1353, 1302, 1247, 1196, 1120, 1073, 1040, 1028, 931, 913, 893, 854, 836, 735, 707, 682, 671, 653, 638, 630, 612 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 47.14; H, 2.74; N, 21.14

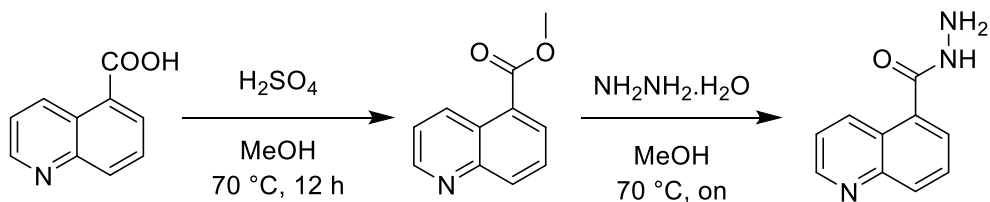
nalezeno C, 47.22; H, 2.85; N, 21.27

4.1.2.2 Syntéza *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidů

Látky byly připravené obecně reakcí chinolin-5-karboxylové kyseliny a příslušně nitrovaného hydrazidu (látky EF09, EF10, EF14). Pro přípravu látky EF20 nebyl potřebný hydrazid komerčně dostupný, proto bylo potřeba ho připravit.

4.1.2.2.1 Syntéza chinolin-5-karbohydrazidu

Syntéza spočívala v přípravě methylesteru kyseliny chinolin-5-karboxylové a jeho následné hydrazinolýze (Obr. 23).



Obrázek 23 Schéma syntézy chinolin-5-karbohydrazidu; on – over night (přes noc)

Syntéza methyl-chinolin-5-karboxylátu

3,5 mmol chinolin-5-karboxylové kyseliny (606 mg) bylo suspendováno ve 20 ml MeOH. Poté byly do směsi za stálého míchání přidány 2 ml koncentrované kyseliny sírové. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla po dobu 12 hodin. Následně byla reakční směs odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v DCM a organická fáze byla extrahována pomocí demineralizované vody, nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu a poté chloridu sodného. Organická fáze byla vysušena pomocí síranu sodného, poté odpařena na RVO a takto připravený methylester byl použit pro další reakci.

Syntéza chinolin-5-karbohydrazidu

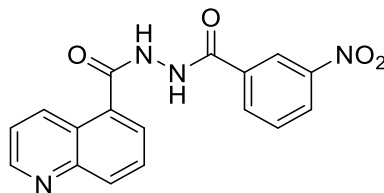
3 mmol methyl-chinolin-5-karboxylátu (561 mg) bylo rozpuštěno ve 20 ml MeOH a do směsi bylo přidáno celkem 16 mmol hydrazin hydrátu ve dvou částech. Směs byla zahřívána na 70 °C pod zpětným chladičem přes noc. Druhý den byla směs odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu a extrahován pomocí demineralizované vody a nasyceného roztoku chloridu sodného. Organická fáze byla vysušena pomocí síranu sodného a poté byla odpařena na RVO. Produkt byl následně suspendován v hexanu, odfiltrován a vysušen proudem vzduchu. Takto připravený hydrazid byl použit pro přípravu látky EF20 dle Metody 3 (viz kapitola 4.1.2.2.2).

4.1.2.2.2 Metoda 3 (EF09, EF10, EF14, EF20)

Postup založení reakce byl stejný jako v metodě 2 (viz kapitola 4.1.2.1.2). Po dvou hodinách byla směs odpařena na RVO. Surové produkty (EF09, EF10, EF14 a EF20) byly rozpuštěny

v DCM a společně s demineralizovanou vodou byly převedeny do dělicí nálevky. Po prvním protřepání došlo k vysrážení produktu v organické vrstvě. Organická vrstva byla oddělena od vodní vrstvy, zfiltrována a surové produkty byly vysušeny pomocí proudu vzduchu. Látky EF09 a EF14 bylo potřeba přechistit. EF09 byl promyt acetonem, ve kterém byl produkt nerozpustný, poté byl produkt vysušen. Látka EF14 byla přechištěna pomocí sloupcové chromatografie (MF – DCM:MeOH 93:7 V/V), spojené frakce byly odpařeny na RVO a produkt byl suspendován v hexanu, odfiltrován a vysušen.

4.1.2.2.3 Charakterizace *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidů *N'*-(3-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF09)



Obrázek 24 *N'*-(3-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF09)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	336,31
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	49 %
Teplota tání:	245,8-247,9 °C
R _f :	0,40

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.08 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 8.98 – 8.94 (m, 1H), 8.83 – 8.76 (m, 2H), 8.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H), 7.64 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.51, 164.43, 151.61, 148.45, 148.05, 134.41, 134.22, 134.17, 133.15, 132.19, 131.07, 129.20, 127.20, 126.77, 125.86, 122.84, 122.79.

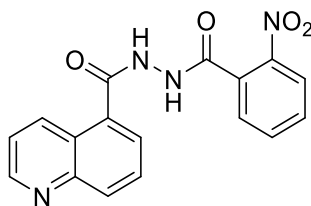
IR (ATR): 3188, 3083, 3019, 1662, 1612, 1600, 1585, 1568, 1534, 1505, 1489, 1459, 1410, 1394, 1348, 1319, 1268, 1141, 1116, 1094, 1075, 1052, 1001, 946, 903, 893, 847, 825, 814, 787, 718, 663, 640, 629, 620, 613 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 60.71; H, 3.60; N, 16.66

nalezeno C, 60.88; H, 3.72; N, 16.53

N'-(2-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF10)



Obrázek 25 *N'*-(2-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF10)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	336,31
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	88 %
Teplota tání:	268,6-269,5 °C
R _f :	0,43

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.83 (s, 1H), 10.79 (s, 1H), 8.95 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.75 (ddd, *J* = 8.6, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.15 (ddd, *J* = 7.5, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 8.1, 1.1 Hz, 1H), 7.88 – 7.85 (m, 1H), 7.82 – 7.78 (m, 4H), 7.62 (dd, *J* = 8.6, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.32, 165.41, 151.56, 148.06, 147.89, 134.30, 134.13, 132.95, 132.32, 130.71, 130.15, 129.14, 128.89, 126.90, 125.86, 124.93, 122.75.

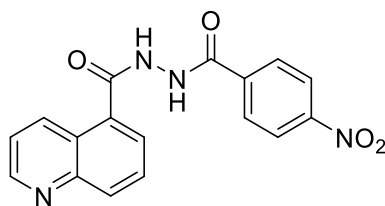
IR (ATR): 3173, 3020, 2846, 1669, 1612, 1602, 1573, 1532, 1503, 1463, 1444, 1403, 1391, 1355, 1315, 1269, 1139, 1053, 965, 934, 868, 851, 832, 802, 789, 756, 744, 731, 699, 640 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 60.71; H, 3.60; N, 16.66

nalezeno C, 60.82; H, 3.73; N, 16.56

N'-(4-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF14)



Obrázek 26 *N'*-(4-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF14)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₂ N ₄ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	336,31
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	46 %
Teplota tání:	258,9-260,7 °C
R _f :	0,55

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.01 (s, 1H), 10.70 (s, 1H), 8.96 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.80 (ddd, *J* = 8.6, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 8.39 – 8.34 (m, 2H), 8.20 – 8.12 (m, 3H), 7.87 – 7.80 (m, 2H), 7.64 (dd, *J* = 8.6, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.49, 164.89, 151.62, 150.06, 148.07, 138.48, 134.15, 133.14, 132.21, 129.62, 129.19, 126.75, 125.86, 124.37, 122.79.

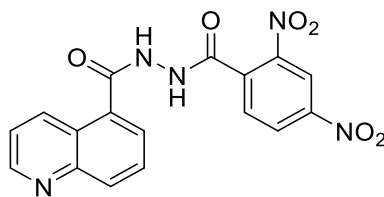
IR (ATR): 3193, 1616, 1598, 1574, 1531, 1504, 1474, 1464, 1404, 1392, 1351, 1319, 1267, 1136, 1117, 1055, 1016, 933, 873, 849, 833, 802, 788, 778, 713, 668, 618 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 60.71; H, 3.60; N, 16.66

nalezeno C, 60.85; H, 3.68; N, 16.51

N'-(2,4-Dinitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF20)



Obrázek 27 *N'*-(2,4-Dinitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF20)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₁ N ₅ O ₆
Relativní molekulová hmotnost:	381,30
Popis:	Červená krystalická látka
Výtěžek:	78 %
Teplota tání:	271,8-273,5 °C
R _f :	0,39

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.11 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 8.95 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.77 – 8.65 (m, 2H), 8.21 – 8.13 (m, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.86 – 7.80 (m, 2H), 7.66 – 7.55 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167.24, 164.01, 151.60, 149.01, 148.04, 147.83, 135.66, 134.03, 132.63, 132.33, 131.82, 129.17, 128.98, 127.01, 125.83, 122.82, 120.54.

IR (ATR): 3176, 3080, 2978, 1690, 1655, 1602, 1551, 1532, 1503, 1471, 1404, 1350, 1318, 1288, 1226, 1178, 1138, 1124, 1054, 1003, 918, 890, 856, 836, 810, 728, 664, 652, 623, 612 cm⁻¹.

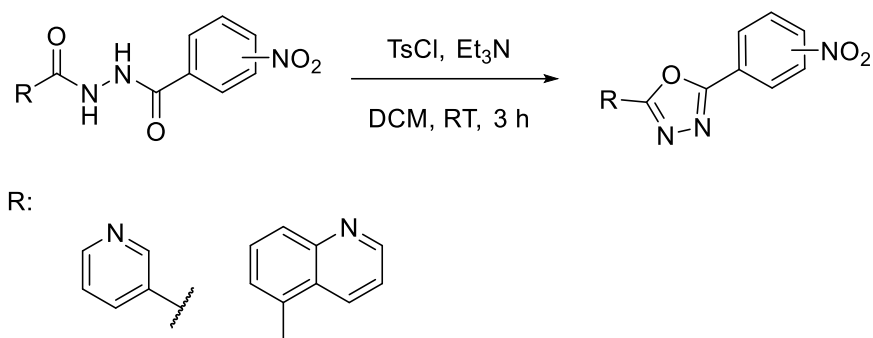
Elementární analýza:

vypočteno C, 53.55; H, 2.91; N, 18.37

nalezeno C, 53.63; H, 2.85; N, 18.45

4.1.3 Syntéza 1,3,4-oxadiazolů a jejich charakterizace

Syntéza nikotinových a chinolinových derivátů 1,3,4-oxadiazolu probíhala podle shodného postupu – schéma uvádí Obr. 28.



Obrázek 28 Schéma přípravy 1,3,4-oxadiazolů; *TsCl* – *p*-toluensulfonylchlorid; *DCM* – dichlormethan; *RT* – room temperature (laboratorní teplota)

4.1.3.1 Syntéza 1,3,4-oxadiazolů

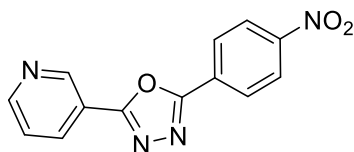
1 ekvivalent příslušně nitrovaného *N'*-acyl(hetero)arylhyaide (1 mmol) byl suspendován v 50 ml *DCM*. Za současného míchání byly do směsi přidány 3 ekvivalenty *p*-toluensulfonylchloridu (3 mmol, 572 mg) a potom bylo přikapáno 5 ekvivalentů triethylaminu (5 mmol, 697 μl). Reakční směs byla ponechána reagovat do přijatelné konverze dle TLC. Další postup zpracování se u nikotinových a chinolinových derivátů lišil.

V případě EF02, EF06, EF07, EF13 byl *DCM* odpařen na *RVO*. Surové produkty byly suspendovány v ethyl-acetátu a vysrážený triethylamonium-chlorid byl odfiltrován a filtrát byl odpařen do sucha na *RVO*. Surové produkty pak byly vyčištěny pomocí sloupcové chromatografie (gradientová eluce MF – *DCM* \rightarrow *DCM*:*MeOH* 97:3 V/V). Spojené frakce byly odpařeny na *RVO* a produkty byly suspendovány pomocí přídavku hexanu. Výsledné produkty byly odfiltrovány a vysušeny pomocí proudu vzduchu.

V případě EF11, EF12, EF15 a EF21 byla reakční směs převedena do dělicí nálevky a byla extrahována pomocí demineralizované vody, nasyceného roztoku chloridu amonného a chloridu sodného. Organická fáze byla vysušena síranem sodným a odpařena na *RVO*. Sloučeniny byly přečištěny pomocí sloupcové chromatografie (MF – *DCM*:*MeOH* 97:3 V/V). Spojené frakce byly odpařeny na *RVO* a produkty byly suspendovány pomocí přídavku hexanu. Výsledné produkty byly odfiltrovány a vysušeny pomocí proudu vzduchu.

4.1.3.2 Charakterizace 1,3,4-oxadiazolů

2-(4-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF02)



Obrázek 29 2-(4-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF02)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	268,23
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	46 %
Teplota tání:	212,8-215,3 °C (222-224 °C) [32]
R _f :	0,6

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.30 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 8.81 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.50 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1H), 8.44 – 8.41 (m, 2H), 8.40 – 8.37 (m, 2H), 7.65 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.70, 163.64, 153.36, 149.87, 148.15, 135.04, 129.29, 128.74, 125.16, 124.93, 120.29.

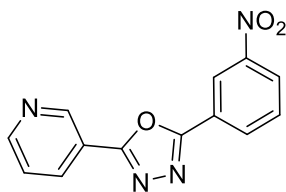
IR (ATR): 1601, 1575, 1553, 1543, 1515, 1484, 1464, 1434, 1411, 1340, 1318, 1298, 1276, 1164, 1110, 1077, 1025, 1012, 994, 965, 859, 817, 762, 724, 704, 683, 642, 620 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 58.21; H, 3.01; N, 20.89

nalezeno C, 58.33; H, 3.14; N, 20.94

2-(3-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF06)



Obrázek 30 2-(3-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF06)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	268,23
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	31 %
Teplota tání:	185,7-187,4 °C (192 °C) [33]
R _f :	0,52

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.33 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.84 – 8.79 (m, 2H), 8.54 (ddt, $J = 14.9, 8.0, 1.6$ Hz, 2H), 8.45 (ddd, $J = 8.3, 2.4, 1.0$ Hz, 1H), 7.91 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $J = 8.0, 4.8$ Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.49, 163.47, 153.30, 148.88, 148.15, 135.06, 133.42, 131.89, 127.12, 125.25, 124.91, 121.86, 120.29.

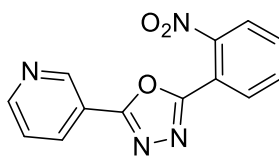
IR (ATR): 3083, 1596, 1550, 1523, 1480, 1461, 1435, 1354, 1331, 1312, 1290, 1264, 1089, 1068, 1040, 1024, 1002, 976, 962, 910, 872, 820, 745, 722, 703, 671, 636, 621 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 58.21; H, 3.01; N, 20.89

nalezeno C, 58.35; H, 3.12; N, 20.97

2-(2-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF07)



Obrázek 31 2-(2-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF07)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₈ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	268,23
Popis:	Bíložlutá krystalická látka
Výtěžek:	41 %
Teplota tání:	116,4-118,1 °C (89 °C) [34]
R _f :	0,43

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.20 (dd, *J* = 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.81 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H), 8.40 (ddd, *J* = 8.0, 2.3, 1.6 Hz, 1H), 8.18 (m, 2H), 7.98 – 7.89 (m, 2H), 7.65 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.61, 161.51, 153.45, 148.50, 147.94, 134.98, 134.22, 134.19, 131.91, 125.33, 125.04, 120.06, 117.21.

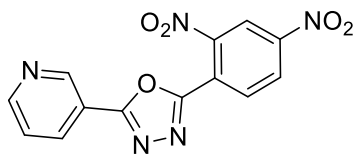
IR (ATR): 3100, 2926, 2804, 1603, 1577, 1557, 1524, 1468, 1447, 1433, 1412, 1351, 1315, 1285, 1255, 1192, 1118, 1068, 1026, 991, 966, 856, 814, 787, 756, 730, 709, 701, 649, 622 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 58.21; H, 3.01; N, 20.89

nalezeno C, 58.35; H, 3.16; N, 20.95

2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF13)



Obrázek 32 2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF13)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₇ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	313,23
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	42 %
Teplota tání:	178,5-181,3 °C
R _f :	0,53

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.26 (dd, *J* = 2.2, 0.9 Hz, 1H), 9.02 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.86 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 1H), 8.74 (ddd, *J* = 8.6, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 8.55 – 8.50 (m, 1H), 8.49 – 8.41 (m, 1H), 7.70 (ddt, *J* = 8.0, 4.8, 0.9 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.06, 160.02, 153.63, 149.96, 148.36, 148.07, 135.09, 133.02, 128.11, 124.99, 121.51, 120.59, 119.79.

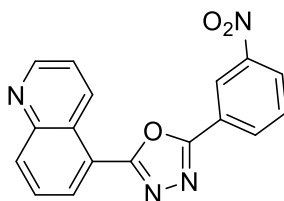
IR (ATR): 3063, 1601, 1576, 1543, 1524, 1482, 1420, 1371, 1352, 1341, 1267, 1195, 1115, 1094, 1057, 1025, 1002, 965, 937, 917, 907, 862, 833, 824, 743, 729, 706, 662, 636 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 49.85; H, 2.25; N, 22.36

nalezeno C, 49.92; H, 2.11; N, 22.47

2-(3-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF11)



Obrázek 33 2-(3-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF11)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	318,29
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	62 %
Teplota tání:	230,9-232,6 °C
R _f :	0,52

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.55 (ddd, *J* = 8.6, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 9.04 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.86 (td, *J* = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 8.60 (ddd, *J* = 7.7, 1.7, 1.0 Hz, 1H), 8.55 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 8.48 (ddd, *J* = 8.3, 2.4, 1.0 Hz, 1H), 8.30 (dt, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.94 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.46, 163.02, 151.86, 149.11, 148.45, 134.34, 134.32, 133.49, 131.86, 129.82, 129.52, 126.95, 125.61, 125.51, 123.63, 121.96, 120.57.

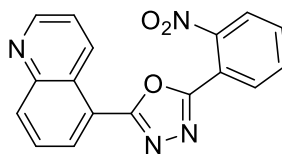
IR (ATR): 3063, 1625, 1524, 1504, 1466, 1414, 1351, 1318, 1266, 1133, 1116, 1071, 1046, 985, 947, 912, 875, 833, 806, 741, 728, 706, 672, 649, 630 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 64.15; H, 3.17; N, 17.60

nalezeno C, 64.26; H, 3.04; N, 17.68

2-(2-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF12)



Obrázek 34 2-(2-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF12)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	318,29
Popis:	Nažloutlá krystalická látka
Výtěžek:	75 %
Teplota tání:	174,8-176,0 °C
R _f :	0,52

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.47 (dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 1H), 9.07 (dd, *J* = 4.2, 1.7 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.25 (ddd, *J* = 7.9, 3.8, 1.5 Hz, 2H), 8.04 – 7.93 (m, 3H), 7.78 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): 164.44, 160.95, 151.96, 148.48, 148.20, 134.43, 134.19, 134.15, 134.11, 131.93, 129.63, 129.55, 125.28, 125.27, 123.76, 120.11, 117.25.

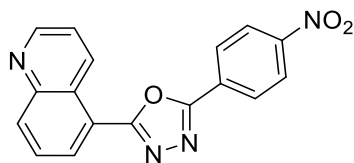
IR (ATR): 3081, 1578, 1557, 1537, 1522, 1506, 1466, 1416, 1349, 1316, 1307, 1276, 1249, 1198, 1130, 1067, 1046, 1012, 968, 947, 856, 807, 788, 760, 743, 729, 719, 690, 646 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 64.15; H, 3.17; N, 17.60

nalezeno C, 64.23; H, 3.08; N, 17.71

2-(4-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF15)



Obrázek 35 2-(4-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF15)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	318,29
Popis:	Nažloutlá krystalická látka
Výtěžek:	26 %
Teplota tání:	222,2-224,4 °C
R _f :	0,52

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.52 – 9.47 (m, 1H), 9.01 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.46 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 8.44 (s, 0H), 8.43 – 8.40 (m, 2H), 8.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.27 (dt, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 8.4, 7.3 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164.56, 162.97, 151.92, 149.82, 148.26, 134.41, 134.38, 129.82, 129.60, 129.33, 128.78, 125.39, 125.12, 123.75, 120.36.

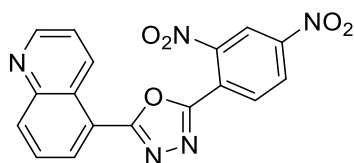
IR (ATR): 3104, 1607, 1553, 1531, 1518, 1504, 1466, 1420, 1409, 1362, 1339, 1317, 1267, 1211, 1200, 1130, 1106, 1091, 1075, 1042, 1011, 946, 855, 828, 806, 761, 729, 706, 652, 640 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 64.15; H, 3.17; N, 17.60

nalezeno C, 64.29; H, 3.07; N, 17.73

2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF21)



Obrázek 36 2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF21)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₉ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	363,29
Popis:	Nažloutlá krystalická látka
Výtěžek:	36 %
Teplota tání:	206,4-207,9 °C
R _f :	0,35

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.39 (ddd, *J* = 8.7, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 9.03 (dd, *J* = 4.1, 1.6 Hz, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.70 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.31 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 2H), 7.96 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.09, 159.76, 152.00, 150.13, 148.60, 148.38, 134.77, 134.08, 133.37, 129.86, 129.57, 128.19, 125.49, 123.76, 122.06, 120.66, 120.05.

IR (ATR): 3101, 1604, 1556, 1545, 1532, 1505, 1465, 1422, 1405, 1377, 1353, 1345, 1304, 1271, 1210, 1155, 1127, 1060, 1040, 1015, 976, 947, 915, 906, 847, 833, 808, 758, 736, 694, 662, 638, 612 cm⁻¹.

Elementární analýza:

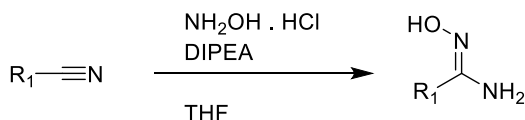
vypočteno C, 56.21; H, 2.50; N, 19.28

nalezeno C, 56.29; H, 2.58; N, 19.35

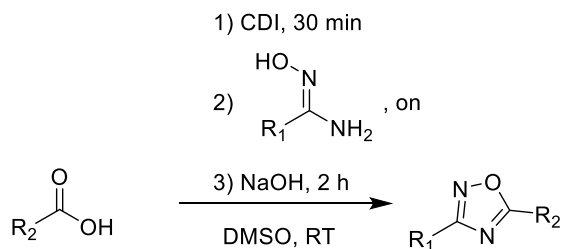
4.1.4 Syntéza 1,2,4-oxadiazolů a jejich charakterizace

Pro přípravu 1,2,4-oxadiazolů bylo potřeba nejdříve připravit vybrané imidamidy (synonymum amidoximy). Schéma syntézy amidoximů a 1,2,4-oxadiazolů je uvedeno na Obr. 37.

Syntéza amidoximů



Syntéza 1,2,4-oxadiazolů



Obrázek 37 Syntéza amidoximů (EE1, EE2) a 1,2,4-oxadiazolů (EE3, EE4, EE5, EE6); DIPEA – *N,N*-diisopropylethylamin; THF – tetrahydrofuran; CDI – 1,1'-karbonyldiimidazol; DMSO – dimethylsulfoxid; RT – room temperature (laboratorní teplota)

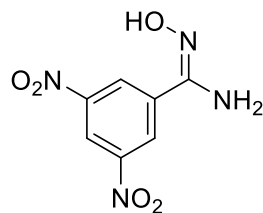
4.1.4.1 Syntéza amidoximů

1 mmol příslušného nitrilu byl rozpuštěn v 10 ml THF. Ke vzniklému roztoku bylo přidáno 1,7 ekvivalentu *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA; 296 μl) a 1,5 ekvivalentu hydroxylamin hydrochloridu (104 mg). Reakční směs byla po dobu 3 hodin zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 70 °C. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu a byl extrahován pomocí nasyceného roztoku chloridu amonného a chloridu sodného. Organická fáze byla vysušena síranem sodným a odpařena na RVO do sucha. V případě potřeby (EE2) byl produkt dále přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (gradientová eluce MF – DCM \rightarrow DCM:MeOH 97:3 V/V \rightarrow čistý MeOH).

4.1.4.2 Syntéza 1,2,4 oxadiazolů [35]

K roztoku příslušné karboxylové kyseliny (1,4 mmol) v 5 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) se přidalo 1,2 ekvivalentu 1,1'-karbonyldiimidazolu (1,68 mmol, 272 mg). Po 30 minutách byl do reakční směsi přidán 1 ekvivalent (vztažen vůči karboxylové kyselině) příslušného amidoximu a reakce byla ponechána přes noc na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Poté bylo do reakční směsi rychle přidáno 1,2 ekvivalentu (vztažen ke karboxylové kyselině) předem rozdrceného NaOH. Po dvou hodinách bylo do reakce přidáno 30 ml studené demineralizované vody. Vzniklá suspenze byla odfiltrována a pevný podíl byl vysušen nejprve proudem vzduchu, poté v exsikátoru pod vakuem. Surový produkt byl rozpuštěn v MeOH, odpařen s přidavkem silikagelu a přečištěn pomocí kolonové chromatografie (MF – DCM:MeOH 97:3 V/V). V případě látky EE6 byla k přečištění použita sloupcová chromatografie s gradientovou elucí MF hexan \rightarrow hexan:ethyl-acetát 7:3 V/V .

4.1.4.3 Charakterizace amidoximů a 1,2,4-oxadiazolů N'-Hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamid (EE1)



Obrázek 38 N'-Hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamid (EE1)

Sumární vzorec:	C ₇ H ₆ N ₄ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	226,15
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	97 %
Teplota tání:	181,8-183,7 °C (199-201 °C) [36]
R _f :	0,63

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.30 (s, 1H), 8.88 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 8.80 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.37 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): 148.29, 147.91, 136.46, 125.29, 118.54.

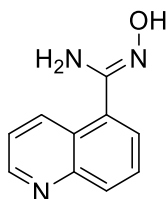
IR (ATR): 3473, 3379, 3107, 2922, 2360, 2342, 1660, 1608, 1589, 1483, 1458, 1395, 1344, 1325, 1250, 1159, 1120, 1080, 955, 916, 903, 862, 815, 760, 731, 703, 644 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 37.18; H, 2.67; N, 24.77

nalezeno C, 37.25; H, 2.73; N, 24.65

N'-Hydroxychinolin-5-karboximidamid (EE2) [37]



Obrázek 39 N'-Hydroxychinolin-5-karboximidamid (EE2)

Sumární vzorec:	C ₁₀ H ₉ N ₃ O
Relativní molekulová hmotnost:	187,2
Popis:	Šedá krystalická látka
Výtěžek:	56 %
Teplota tání:	184,1-185,6 °C
R _f :	0,35

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.75 (s, 1H), 8.90 – 8.86 (m, 1H), 8.71 – 8.68 (m, 1H), 8.02 – 8.00 (m, 1H), 7.75 – 7.73 (m, 1H), 7.66 – 7.64 (m, 1H), 7.54 – 7.51 (m, 1H), 6.10 (s, 2H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.03, 148.23, 134.85, 132.67, 131.58, 130.46, 129.26, 127.30, 126.63, 122.04.

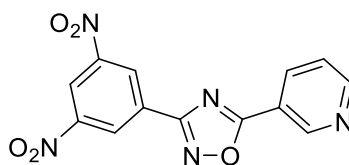
IR (ATR): 3452, 3346, 3158, 3046, 1656, 1608, 1589, 1506, 1476, 1402, 1316, 1212, 1137, 1120, 1050, 1001, 955, 917, 873, 830, 803, 769, 651, 642, 617 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 64.16; H, 4.85; N, 22.45

nalezeno C, 64.23; H, 4.73; N, 22.61

3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE3)



Obrázek 40 3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE3)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₇ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	313,23
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	51 %
Teplota tání:	163,9-165,4 °C
R _f :	0,46

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.39 – 9.35 (m, 1H), 9.06 – 9.04 (m, 2H), 9.00 – 8.98 (m, 1H), 8.90 – 8.87 (m, 1H), 8.61 – 8.58 (m, 1H), 7.71 – 7.67 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 175.49, 166.39, 154.63, 149.35, 149.23, 136.41, 129.19, 127.45, 125.10, 121.69, 120.13.

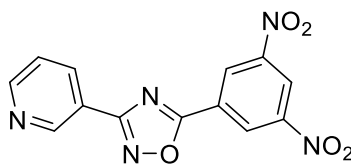
IR (ATR): 3102, 1680, 1659, 1639,1608, 1596, 1582, 1554, 1543, 1519, 1454, 1430, 1415, 1346, 1319, 176, 1114, 1075, 1025, 922, 912, 824, 762, 757, 730, 711, 700, 663, 652, 621 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 49.85; H, 2.25; N, 22.36

nalezeno C, 49.92; H, 2.38; N, 22.49

5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE4)



Obrázek 41 5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE4)

Sumární vzorec:	C ₁₃ H ₇ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	313,23
Popis:	Běžová krystalická látka
Výtěžek:	45 %
Teplota tání:	158,1-160,9 °C (137-139 °C) [38]
R _f :	0,35

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.27 – 9.25 (m, 1H), 9.15 – 9.12 (m, 2H), 9.08 – 9.05 (m, 1H), 8.81 – 8.78 (m, 1H), 8.47 – 8.44 (m, 1H), 7.64 – 7.61 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.31, 167.63, 153.25, 149.41, 148.48, 135.39, 128.38, 126.53, 124.88, 122.84, 122.50.

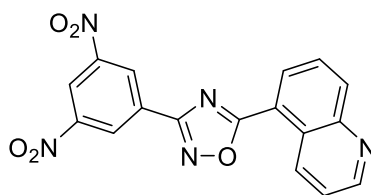
IR (ATR): 3097, 2985, 2887, 1634, 1537, 1600, 1537, 1448, 1429, 1347, 1318, 1166, 1106, 1093, 1029, 966, 920, 821, 764, 756, 728, 705, 655, 624 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 49.85; H, 2.25; N, 22.36

nalezeno C, 49.98; H, 2.37; N, 22.46

3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE5)



Obrázek 42 3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE5)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₉ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	363,29
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	41 %
Teplota tání:	204,4-206,4 °C
R _f :	0,38

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.53 – 9.49 (m, 1H), 9.13 – 9.10 (m, 2H), 9.07 – 9.05 (m, 1H), 9.02 – 8.99 (m, 1H), 8.58 – 8.55 (m, 1H), 8.40 – 8.36 (m, 1H), 8.02 – 7.97 (m, 1H), 7.85 – 7.81 (m, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 176.06, 166.34, 152.17, 149.37, 148.21, 135.87, 134.06, 131.34, 129.67, 129.45, 127.56, 125.61, 124.14, 121.68, 120.20.

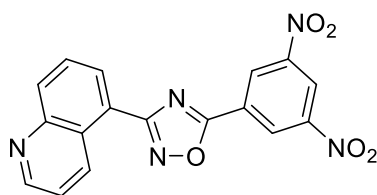
IR (ATR): 3094, 2921, 2851, 1633, 1594, 1550, 1541, 1519, 1506, 1457, 1411, 1396, 1343, 1322, 1297, 1271, 1213, 1172, 1131, 1104, 1076, 1051, 1043, 1019, 991, 949, 924, 913, 839, 821, 768,752, 731, 707, 654, 648, 630, 612 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 56.21; H, 2.50; N, 19.28

nalezeno C, 56.29; H, 2.62; N, 19.20

5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE6)



Obrázek 43 5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE6)

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₉ N ₅ O ₅
Relativní molekulová hmotnost:	363,29
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	21 %
Teplota tání:	246,8-248,8 °C
R _f :	0,36

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.20 (ddd, *J* = 8.7, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 9.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 9.07 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 9.00 (dd, *J* = 4.1, 1.7 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 8.26 (dt, *J* = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.7, 4.1 Hz, 1H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.43, 168.98, 151.64, 149.50, 148.61, 134.25, 133.91, 130.28, 129.49, 128.37, 126.77, 125.97, 123.46, 123.31, 122.73.

IR (ATR): 3084, 1633, 1601, 1568, 1541, 1508, 1464, 1400, 1342, 1335, 1311, 1291, 1208, 1162, 1136, 1103, 1075, 1049, 998, 946, 918, 863, 838, 813, 766, 752, 731, 712, 675, 656, 649, 645, 623 cm⁻¹.

Elementární analýza:

vypočteno C, 56.21; H, 2.50; N, 19.28

nalezeno C, 56.27; H, 2.65; N, 19.19

4.2 BIOCHEMIE

4.2.1 Metodika stanovení inhibiční aktivity AChE a BuChE [39]

Účinnost všech připravených sloučenin byla vyjádřena pomocí hodnoty IC_{50} , která popisuje jejich inhibiční aktivitu. Je to taková koncentrace inhibitoru, která je potřebná pro pokles aktivity enzymu na 50 %. Tato veličina byla stanovena pomocí spektrofotometrické modifikované Ellmanovy metody, která kvantifikuje množství -SH nebo S-S skupin. Princip metody spočívá v měření rychlosti vzniku thiocholinu, jakožto produktu hydrolýzy acetylthiocholinu (ATCh), potažmo butyrylthiocholinu (BTCh), příslušnou CHE ve vodném prostředí. Vzniklý thiocholin reaguje s Ellmanovým činidlem (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), DTNB) za vzniku žlutého produktu, který je spektrofotometricky detekován při vlnové délce 412 nm.

Reakční směs, která byla použita pro stanovení enzymatické aktivity, měla objem 2000 μ l a obsahovala 40 μ M ATCh, potažmo BTCh, s aktivitou 0,2 U/ml a DTNB o koncentraci 100 μ M pro všechny reakce. Na veškeré ředění byla použita demineralizovaná voda. Testované látky jakožto potenciální inhibitory byly testovány v osmi různých koncentracích. Zároveň byl připraven srovnávací roztok, ve kterém nebyla obsažena ani testovaná látka, ani CHE. Pomocí změřené absorbance bylo vypočítáno procento inhibice pro konkrétní koncentrace. Výsledné hodnoty procent inhibice pak byly zaneseny do grafu proti molární koncentraci inhibitoru. Tam, kde se křivka, která vznikla propojením vzniklých bodů, protne s hodnotou 50 % inhibice enzymu, je hodnota IC_{50} . Jako referenční látka byl použit rivastigmin. Jeho hodnoty IC_{50} pro AChE i BuChE byly získány z [39].

Testování bylo provedeno na Katedře biologických a biochemických věd na Fakultě chemicko-technologické Univerzity Pardubice Mgr. Šárkou Štěpánkovou, Ph.D.

4.3 BIOLOGIE

4.3.1 Metodika hodnocení antimykobakteriální aktivity [40]

1,3,4-Oxadiazoly a jejich prekurzory byly hodnoceny *in vitro* jako potenciální sloučeniny účinné proti mykobakteriím. Při testování potenciální antimykobakteriální aktivity byly testovány kmeny *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 v ředění 10^{-3} a dva kmeny netuberkulózních mykobakterií: *Mycobacterium avium* 330/88 v ředění 10^{-5} , které je rezistentní na isoniazid, rifampicin, ofloxacin a ethambutol, dále *Mycobacterium kansasii* 235/80 v ředění 10^{-4} .

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací bylo prováděno mikrometodou v půdě Middlebrook 7H9 Broth Base v plastických P-destičkách. Testované sloučeniny byly neředěny roztokem DMSO tak, aby výsledné koncentrace činily 1000, 500, 250, 125, 62,5, 32, 16, 8, 4, 2 a 1 μM . Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly odečteny po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C, u *Mycobacterium kansasii* navíc už po 7 dnech.

MIC udává nejnižší koncentraci, při které byla ještě pozorována úplná inhibice růstu mykobakterií. Jako referenční látka byl použit isoniazid jakožto antituberkulotikum 1. linie, který byl před testováním naředěn sterilní destilovanou vodou. Testování bylo provedeno externě ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, laboratoři pro diagnostiku mykobakterií a tuberkulózy RNDr. Jiřinou Stolaříkovou a Mgr. Janou Korbielovou.

4.3.2 Metodika hodnocení antibakteriální aktivity [41], [42]

U 1,3,4-oxadiazolů a jejich prekurzorů byla otestována antibakteriální aktivita proti jednomu grampozitivnímu kmenu: *Staphylococcus aureus* (SA), subsp. *aureus*, ATCC (American Type Culture Collection) 29213, CCM (Czech Collection of Microorganisms) 4223 a jednomu gramnegativnímu kmenu: *Escherichia coli* (EC), ATCC 25922, CCM 2954,. V případě, že látka vykazala aktivitu, byla pak dotestována na ostatní klinicky významné grampozitivní a gramnegativní kmeny. Potenciálně tak byly testovány čtyři grampozitivní kmeny: SA, methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), subsp. *aureus* ATCC 43300, CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* (SE), ATCC 12228, CCM 4418, *Enterococcus faecalis* (EF), ATCC 29212, CCM 4224, a čtyři gramnegativní kmeny: EC, *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 10031, CCM 4415, *Acinetobacter baumannii*, ATCC 19606, DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) 30007, a *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, CCM 3955.

Stanovení antibakteriální aktivity byla provedeno pomocí mikrodiluční bujonové metody v destičkách podle standardu EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Každá jamka v mikrodiluční destičce obsahovala 200 μ l media a 10 μ l suspenze inokula. Jako medium byl použit Mueller Hintonův bujon č. 2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulum odpovídalo velikosti 0,5 dle stupnice McFarlanda ($1,5 \times 10^8$ CFU (colony forming units)/ml). Inkubace probíhala při teplotě $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ po dobu 24–48 h a byla statická, ve tmě a v humidní atmosféře. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO na výslednou koncentraci 0,49-500 μ M. Po inkubaci testovaných sloučenin s osmi klinicky významnými kmeny byla odečtena MIC (μ M), která odpovídá 95 % inhibovaných bakterií. Inhibice růstu bakterií byla stanovena vizuálně. Jako standard bylo použito beta-laktamové antibiotikum piperacilin. Jeho hodnoty MIC byly získány z [43].

Testování bylo provedeno Idou Dufkovou z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

4.3.3 Metodika hodnocení antifungální aktivity [41]

U 1,3,4-oxadiazolů a jejich prekurzorů byla otestována jejich antifungální aktivita proti jednomu kmenu kvasinek: *Candida albicans* (CA) ATCC 24433 a jednomu kmenu vláknitých hub *Trichophyton interdigitale* (TI) ATCC 9533, CCM 8377. Pokud by látka vykazala dobrý biologický účinek, bylo v plánu testování na dalších šesti kmenech, ale vzhledem k nízké účinnosti se tak nestalo.

Stanovení antifungální aktivity bylo opět provedeno pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách podle standardů EUCAST. Každá jamka obsahovala 200 μ l média a 10 μ l suspenze inokula. Jako médium byl použit RPMI-1640 s glutaminem a 2 % glukózou a pH bylo upraveno na 7,0 pomocí 3-(*N*-morfolino)propansulfonové kyseliny o 0,165M koncentraci. Výsledné inokulum mělo velikost $0,5-2 \times 10^5$ CFU/ml. Inkubace probíhala při teplotě 35 ± 2 °C (v případě TI 25-28 °C) a trvala 24-48 h (v případě TI 5-7 dní), při statických podmínkách, ve tmě a při humidní atmosféře. Inhibice růstu hub byla odečtena vizuálně. Jako standard bylo použito triazolové antimykotikum flukonazol. Jeho hodnoty byly získány z [43].

Hodnoty MIC stanovila Ida Dufková z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5 DISKUZE A VÝSLEDKY

5.1 CHEMICKÉ HODNOCENÍ

Design sloučenin byl založen na námi dříve připravených a zatím nepublikovaných derivátech založených na molekulární hybridizaci 3,5-dinitrobenzoové kyseliny a nikotinohydrazidu, resp. chinolin-5-karbohydrazidu. Ty se ukázaly být účinnými inhibitory CHE i růstu mykobakterií, proto jsme v této práci přikročili k přípravě jejich analog.

V rámci experimentální části práce bylo celkem nasyntetizováno dvacet dva sloučenin: osm sloučenin vycházejících z 1,3,4-oxadiazolu (EF02, EF06, EF07, EF13, EF11, EF12, EF15, EF21), osm jejich prekurzorů – čtyři *N'*-acylnikotinohydrazidy (EF01, EF03, EF04, EF05) a čtyři *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidy (EF09, EF10, EF14, EF20), čtyři sloučeniny vycházející z 1,2,4-oxadiazolů (EE3, EE4, EE5, EE6) a dva jejich prekurzory (*N'*-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamid EE1 a *N'*-hydroxychinolin-5-karboximidamid EE2).

Metoda 1 (viz kapitola 4.1.2.1.1) spočívala v reakci příslušného hydrazidu s acyl chloridem v přítomnosti baze (EF01). Jako další možnost syntézy *N'*-acylnikotinohydrazidů byla reakce karboxylové kyseliny s hydrazidem dle metody 2 (viz kapitola 4.1.2.1.2.). Stejný postup byl použit také při syntéze *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidů dle metody 3 (viz kapitola 4.1.2.2.2). Metoda je založená na karbodiimidovém couplingu v přítomnosti HOBt. V případě syntézy *N'*-acylnikotinohydrazidů byla podle dostupnosti výchozích látek provedena reakce s kyselinou nikotinovou a příslušně nitrovaným benzhydrazidem (EF03, EF04), ale i v opačném designu, tj. s nikotinohydrazidem a nitrovanou benzoovou kyselinou (EF05). V případě syntézy *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidů byly látky EF09, EF10 a EF14 připraveny reakcí chinolin-5-karboxylové kyseliny a příslušně nitrovaného hydrazidu. Při přípravě EF20 nebyl hydrazid 2,4-dinitrobenzoové kyseliny komerčně dostupný a nepovedlo se jej připravit, proto byl připraven chinolin-5-karbohydrazid (viz kapitola 4.1.2.2.1) z výchozí kyseliny její esterifikací methanolem a následnou hydrazinolýzou, a látka EF20 tak vznikla jeho reakcí s kyselinou 2,4-dinitrobenzoovou.

Princip cyklizace prekurzorů za vzniku 1,3,4-oxadiazolů byl u *N'*-acylnikotinohydrazidů i *N'*-acylchinolin-5-karbohydrazidů stejný (reakcí s *p*-toluensulfonylchloridem v přítomnosti terciární baze) a je popsán v kapitole 4.1.3. Všechny vzniklé 1,3,4-oxadiazoly bylo potřeba pročistit pomocí sloupcové chromatografie (EF02, EF06, EF07, EF13, EF11, EF12, EF15 a EF21).

Izomerní 1,2,4-oxadiazoly, které byly navrženy na základě biologické aktivity isomerních 1,3,4-oxadiazolů, vznikly reakcí příslušného amidoximu s příslušnou karboxylovou kyselinou za podmínek popsaných v kapitole 4.1.4. Vzhledem k asymetrické substituci na 1,2,4-oxadiazolu bylo možné připravit dva polohové izomery. V případě EE3 a EE4 byly substituenty na oxadiazolovém jádře 3,5-dinitrofenyl a pyridin-3-yl. Princip jejich syntézy spočíval v reakci nikotinové kyseliny a 3,5-dinitrobenzoamidoximu (EE3) nebo v reakci 3,5-dinitrobenzoové kyseliny s *N*-hydroxynikotinimidamidem (EE4). V případě EE5 a EE6 bylo oxadiazolové jádro substituováno kromě 3,5-dinitrofenylem také chinolin-5-ylem. Látky pak vznikly reakcí chinolin-5-karboxylové kyseliny a 3,5-dinitrobenzoamidoximu (EE5) nebo 3,5-dinitrobenzoové kyseliny s *N*-hydroxychinolin-5-karboximidamidem (EE6). Všechny vzniklé oxadiazoly bylo následně potřeba přecistit pomocí sloupcové chromatografie.

Prekurzorové amidoximy, které nebyly dostupné, bylo potřeba připravit (viz kapitola 4.1.4.1), a to reakcí příslušného nitrilu s hydroxylamin hydrochloridem za přítomnosti DIPEA, kdy kondenzací vznikly příslušné amidoximy. Syntéza sloučeniny EE1 proběhla s výtěžkem 97 % a nebylo již potřeba ji přečišťovat. V případě EE2 bylo nutné přecistit látku pomocí sloupcové chromatografie.

Zaznamenané výtěžky byly v rozmezí 21-97 %. Vyšší výtěžky se vyskytovaly při syntézách prekurzorů 1,3,4-, ale také 1,2,4-oxadiazolů. Nejvyšší zaznamenaný výtěžek byl 97 % a byl zaznamenan při výše zmíněné syntéze *N*'-hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamidu (EE1). Nižší výtěžky byly zaznamenány při syntézách oxadiazolů. Nejnižší výtěžek byl 21 % při syntéze 5-(3,5-dinitrofenyl)-3-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazolu (EE6). Takto nízký výtěžek byl způsoben především opakovaním sloupcové chromatografie, kvůli nevhodnému dělení směsi a nutné výměně MF. Konečná chromatografie byla provedena pomocí gradientové eluce MF hexan → hexan:ethyl-acetát 7:3 V/V .

Všechny sloučeniny byly charakterizovány pomocí spektrálních (NMR, IR) a fyzikálních (měření teploty tání a R_f) metod. Elementární analýza byla dále použita k ověření čistoty látek, která byla dostatečná pro testování jejich biologické aktivity.

5.2 BIOCHEMICKÉ HODNOCENÍ

U všech nasyntetizovaných látek byla změřena jejich schopnost inhibovat AChE a BuChE a byla vyjádřena pomocí hodnoty IC_{50} . Získané hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 1), kde byly nejlepší hodnoty zvýrazněny tučně.

Nejvyšší inhibiční aktivitu proti AChE vykazovala sloučenina EF06 (6,68 μ M). Nejnižší hodnotu IC_{50} vůči BuChE vykazovala látka EE4 (45,09 μ M). Hodnoty IC_{50} se pohybovaly v rozmezí 6,68 μ M až 398,44 μ M.

1,3,4-Oxadiazoly měly obecně vyšší inhibiční aktivitu než jejich prekurzory, přičemž vyšší biologický účinek vykazovaly 1,3,4-oxadiazoly se substituovaným pyridin-3-ylem (tj. nikotinové deriváty) oproti 1,3,4-oxadiazolům s chinolin-5-ylem. Nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AChE z nikotinových derivátů vykazovala již zmíněná látka EE06. Jedná se tedy o nikotinový derivát, který je substituovaný fenylem, který je v poloze 3 nitrovaný. Nejnižší hodnotu IC_{50} vůči AChE z chinolinových derivátů má látka EF11, která je také substituovaná 3-nitrofenylem. Druhou nejnižší hodnotu IC_{50} vůči AChE z nikotinových i chinolinových derivátů měly látky, jejichž fenyl byl nitrován v polohách 2 i 4. V případě nitrace pouze v poloze 4 nebo v poloze 2 došlo u nikotinových i chinolinových derivátů ke snížení jejich biologické aktivity vůči AChE. Nejvyšší inhibiční aktivitu proti BuChE vykazuje z 1,3,4-oxadiazolů nikotinový derivát EF02, který má nitrovaný fenyl v poloze 4.

1,2,4-Oxadiazoly vykazovaly obecně nižší inhibiční schopnost vůči AChE, ale naopak vyšší vůči BuChE než 1,3,4-oxadiazoly. V porovnání se svými prekurzory vykazovaly však vyšší schopnost inhibice AChE (jak látky substituované pyridin-3-ylem, tak chinolin-5-ylem) a již zmíněná látka EE4 měla zároveň nejnižší IC_{50} pro BuChE. Jejich prekurzory (EE1 a EE2) vykazovaly také dobrou inhibiční schopnost vůči BuChE.

Z nově nasyntetizovaných látek se celkově jako lepší inhibitory AChE jeví 1,3,4-oxadiazoly substituované pyridin-3-ylem. Jako účinnější inhibitory BuChE se jeví 1,2,4-oxadiazoly a jejich prekurzory (EE1, EE2).

U všech otestovaných látek byl vypočítán index selektivity, který je získán podílem IC_{50} BuChE a IC_{50} AChE a jeho hodnota určuje, zda se jedná o selektivní (index selektivity je vyšší než 10) či neselektivní (index selektivity je nižší než 10) inhibici AChE. Díky této hodnotě se jako selektivní inhibitory prokázaly tři látky odvozené od 1,3,4-oxadiazolů (EF06, EF13, EF21) a jedna látka odvozená od 1,2,4-oxadiazolů (EE5). V případě ostatních látek se jedná

o neselektivní inhibitory. Nejvyšší index selektivity měla látka EF13 a to konkrétně 45,1. Tato sloučenina je odvozena od 1,3,4-oxadiazolu substituovaného 2,4-dinitrofenylem. Stejný strukturální základ má také látka EF21, která také vykazovala selektivní inhibici. Proto se jeví substituce 2,4-dinitrovaným fenylem jako substituce, která zvyšuje selektivitu inhibitorů vůči AChE.

Žádná sloučenina nebyla *in vitro* lepším inhibitorem BuChE než rivastigmin, ale řada z nich byla účinnější vůči AChE.

Látky	AChE	BuChE	Index selektivity
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	(IC ₅₀ BuChE/IC ₅₀ AChE)
Prekurzory 1,3,4-oxadiazolů			
EF01	50,16±1,13	170,27±6,82	3,4
EF03	41,18±1,56	200,67±3,07	4,9
EF04	69,41±3,96	179,45±6,63	2,6
EF05	53,40±1,83	380,63±7,08	7,1
EF09	58,88±4,09	230,90±4,40	3,9
EF10	50,01±1,02	197,08±7,78	3,9
EF14	62,67±2,27	288,91±5,29	4,6
EF20	92,00±5,26	398,44±8,48	4,3
1,3,4-Oxadiazoly			
EF02	12,13±0,23	85,86±1,83	7,1
EF06	6,68±0,12	101,68±2,06	15,2
EF07	19,46±0,12	137,73±6,47	7,1
EF13	7,15±0,40	322,32±5,55	45,1
EF11	20,66±0,73	174,65±9,09	8,5
EF12	30,36±1,30	187,81±1,37	6,2
EF15	59,88±3,93	233,29±4,93	3,9
EF21	29,21±0,04	346,08±6,94	11,8
Prekurzory 1,2,4-oxadiazolů			
EE1	26,37±0,09	65,05±3,42	2,5
EE2	63,26±2,82	60,93±3,25	1,0
1,2,4-Oxadiazoly			
EE3	22,07±1,09	150,75±3,91	6,8
EE4	18,26±0,09	45,09±0,44	2,5
EE5	15,46±0,24	223,12±11,75	14,4
EE6	33,72±2,00	123,03±9,89	3,6
Rivastigmin	56,10±1,41	38,40±1,97	0,7

Tabulka 1 Výsledky inhibice CHE

5.3 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

Biologické hodnocení bylo provedeno pouze u 1,3,4-oxadiazolů a jejich prekurzorů. Hodnocena byla jejich potenciální antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivita.

5.3.1 Antimykobakteriální aktivita

Následující tabulka (Tabulka 2) popisuje výsledky antimykobakteriální aktivity hodnocených látek. Biologická aktivita byla vyjádřena pomocí hodnoty MIC a výsledné hodnoty byly porovnávány s isoniazidem, který byl změřen jako referenční látka.

Dle výsledků měly biologický účinek pouze dvě látky, které vykazovaly účinek pouze proti lékově plně citlivému kmenu *Mycobacterium tuberculosis* 331/88. Byla to látka EF13 a EF21. Obě látky obsahují ve své struktuře 2,4-dinitrovaný fenyl. Sloučenina EF13 je nikotinový a EF21 chinolinový derivát. Nejnižší hodnotu MIC vykazovala látka EF13, pro kterou hodnota MIC činila 2 μM po 14 i 21 dnech.

Vzhledem k výsledkům lze shrnout, že přítomnost 2,4-dinitrofenylu byla zásadní pro inhibiční aktivitu vůči kmenu *Mycobacterium tuberculosis* 331/88.

Proti ostatním testovaným kmenům netuberkulózních mykobakterií látky nevykázaly žádný významný biologický činek, kromě látek EF20 a EF07, které prokázaly mírný účinek vůči kmenu *Mycobacterium kansasii*. V případě obou látek hodnota MIC činila $\geq 500 \mu\text{M}$.

Látky	MIC [μ M]						
	<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M.kansasii</i> 235/80		
	14 dní	21 dní	14 dní	21 dní	7 dní	14 dní	21 dní
Prekurzory 1,3,4-oxadiazolů							
EF01	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EF03	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EF04	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EF05	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EF09	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst
EF10	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst
EF14	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst
EF20	1000	>1000	>1000	>1000	500	500	500
1,3,4-Oxadiazoly							
EF02	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst
EF06	250	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst
EF07	1000	1000	>1000	>1000	500	1000	1000
EF13	2	2	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst	1000 nárůst
EF11	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst
EF12	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst
EF15	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
EF21	4	8	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst
INH	0,5	0,5	>250	>250	2	2	2

Tabulka 2 Výsledky antimykobakteriální aktivity

Zkratky použité v tabulce:

INH	Isoniazid
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

5.3.2 Antibakteriální aktivita

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.3.2, látky byly testovány na jeden gram pozitivní (SA) a na jeden gram negativní kmen (EC). V případě, že látka vykázala aktivitu, tak byla dotestována na zbylé kmeny. Látky EF11, EF12 a EF15 se nepodařilo otestovat z důvodu jejich špatné rozpustnosti v DMSO nebo z důvodu vysrážení se v testovacím médiu (EF12).

Biologický účinek vykázal pouze 2-(2,4-dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF13). Jeho hodnota MIC byla pro SA 125 μM , pro MRSA dokonce 15,62 μM , pro SE 7,81 μM a pro EF 250 μM po 24 hodinách. Na EC látka EF13 neúčinkovala, proto již na zbylé gram negativní kmeny nebyla otestována.

Na následující tabulce (Tabulka 3) jsou shrnuty výsledky jediné látky, která vykázala biologický účinek, tedy EF13. Její antibakteriální aktivita byla vyjádřena pomocí hodnoty MIC.

Kmen (kód)		Testované látky – MIC [μM]	
		EF13	PIP
SA	24 h	125	3,7
	48 h	250	
MRSA	24 h	15,62	29,6
	48 h	31,25	
SE	24 h	7,81	0,23
	48 h	15,62	
EF	24 h	250	3,7
	48 h	250	

Tabulka 3 Výsledky antibakteriální aktivity

Zkratky použité v tabulce:

EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
PIP	Piperacilin

5.3.3 Antifungální aktivita

Jak bylo již popsáno v kapitole 4.3.3, také zde byly látky testovány pouze proti jednomu kmenu kvasinek (CA) a proti jednomu kmenu vláknitých hub (TI). V případě vykazání dobrého biologického účinku byla látka otestována i na zbylé kmeny. Látky EF11, EF12 a EF15 se nepodařilo otestovat ze stejných důvodů, jako bylo uvedeno v kapitole 5.3.2.

Biologický účinek vykazala stejně jako v případě testování antibakteriální aktivity pouze sloučenina EF13. Vykázala účinek pouze proti TI s hodnotou MIC 125 μM po 120 hodinách. Tato biologická aktivita nebyla dostatečná, proto již nebyla testována na zbylé kmeny. Ostatní sloučeniny antifungální aktivitu neprokázaly.

Výsledky testování antifungální aktivity jsou vyjádřeny pomocí hodnoty MIC na následující tabulce (Tabulka 4), kde je uvedena pouze jediná látka, která vykazala biologický účinek (EF13).

Kmen (kód)		Testované látky – MIC [μM]	
		EF13	FLU
TI	120 h	125	52,2
	168 h	250	52,2

Tabulka 4 Výsledky antifungální aktivity

Zkratky použité v tabulce:

FLU	Flukonazol
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>

6 ZÁVĚR

Celkově bylo nasyntetizováno dvacet dva sloučenin, z toho bylo deset prekurzorů (osm pro 1,3,4-oxadiazoly a dva pro 1,2,4-oxadiazoly) a dvanáct oxadiazolů (osm 1,3,4-oxadiazolů a čtyři 1,2,4-oxadiazoly). Sloučeniny byly otestovány na jejich inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. U 1,3,4-oxadiazolů a jejich prekurzorů byla zároveň otestována jejich antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivita.

Byl odvozen vliv substituentů na biologický účinek. Celkově měly 1,3,4-oxadiazoly vyšší inhibiční aktivitu než jejich prekurzory. 1,2,4-Oxadiazoly a jejich prekurzory vykázaly obecně nižší inhibiční schopnost proti AChE, ale vyšší vůči BuChE. Látky prokázaly určitou inhibiční aktivitu CHE, která v některých případech byla porovnatelná s rivastigminem, který je využíván v terapii AD. U všech nasyntetizovaných látek byl vypočítán index selektivity. Bylo zjištěno, že oxadiazolový fragment substituovaný 2,4-dinitrovaným fenylem může mít vliv na selektivitu inhibice.

Antimykobakteriální aktivitu proti kmenu *Mycobacterium tuberculosis* prokázaly pouze EF13 a EF21. Tato aktivita však byla nižší než aktivita referenční látky isoniazidu. Látky EF20 a EF07 vykázaly mírný účinek vůči kmenu *Mycobacterium kansasii*, ale i v tomto případě byl vykázaný biologický účinek nižší než u referenční látky isoniazidu. Mírnou antibakteriální a antifungální aktivitu vykázala pouze EF13, proto bude dalším krokem testování také 1,2,4-oxadiazolů na jejich potenciální antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální aktivitu, které stejně jako látka EF13 obsahují ve své struktuře oxadiazolový kruh substituovaný dinitrovaným fenylem. Dále všechny látky podstoupí plánované testování jejich cytotoxicity. Také u nich bude určen typ inhibice a bude testována jejich antioxidační aktivita.

7 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] P. Scheltens *et al.*, “Alzheimer’s disease,” *The Lancet*, vol. 397, no. 10284. Elsevier B.V., pp. 1577–1590, Apr. 24, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
- [2] N. H. Elghazawy *et al.*, “Discovery of New 1,3,4-Oxadiazoles with Dual Activity Targeting the Cholinergic Pathway as Effective Anti-Alzheimer Agents,” *ACS Chemical Neuroscience*, vol. 13, no. 8, pp. 1187–1205, Apr. 2022, doi: 10.1021/acscemneuro.1c00766.
- [3] T. M. Dhameliya, S. J. Chudasma, T. M. Patel, and B. P. Dave, “A review on synthetic account of 1,2,4-oxadiazoles as anti-infective agents,” *Molecular Diversity*, vol. 26, no. 5. Institute for Ionics, pp. 2967–2980, Oct. 01, 2022. doi: 10.1007/s11030-021-10375-4.
- [4] M. Luczynski and A. Kudelko, “Synthesis and Biological Activity of 1,3,4-Oxadiazoles Used in Medicine and Agriculture,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 8. MDPI, Apr. 01, 2022. doi: 10.3390/app12083756.
- [5] M. A. Deture and D. W. Dickson, “The neuropathological diagnosis of Alzheimer’s disease,” *Molecular Neurodegeneration*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., Aug. 02, 2019. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.
- [6] C. A. Lane, J. Hardy, and J. M. Schott, “Alzheimer’s disease,” *European Journal of Neurology*, vol. 25, no. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 59–70, Jan. 01, 2018. doi: 10.1111/ene.13439.
- [7] M. Zvěřinová, *Alzheimerova demence*, Vydání 1. Praha: Grada, 2017.
- [8] W. J. Huang, X. Zhang, and W. W. Chen, “Role of oxidative stress in Alzheimer’s disease (review),” *Biomedical Reports*, vol. 4, no. 5. Spandidos Publications, pp. 519–522, May 01, 2016. doi: 10.3892/br.2016.630.
- [9] M. Gatz *et al.*, “Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease,” 2006. doi: 10.1001/archpsyc.63.2.168.
- [10] A. R. Borenstein, C. I. Copenhaver, and J. A. Mortimer, “Early-Life Risk Factors for Alzheimer Disease,” *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, vol. 20, no. 1. pp. 63–72, 2006. doi: 10.1097/01.wad.0000201854.62116.d7.

- [11] H. Kubešová and S. Býma, “DEMENCE Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře ,” 2018.
- [12] A. Modir, S. Shamekhi, and P. Ghaderyan, “A systematic review and methodological analysis of EEG-based biomarkers of Alzheimer’s disease,” *Measurement*, vol. 220. Elsevier B.V., Oct. 01, 2023. doi: 10.1016/j.measurement.2023.113274.
- [13] V. Pidrman, *DEMENCE*, 1st ed., vol. 184. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007.
- [14] A. Nowak *et al.*, “The Use of Ginkgo Biloba L. as a Neuroprotective Agent in the Alzheimer’s Disease,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Nov. 04, 2021. doi: 10.3389/fphar.2021.775034.
- [15] S. I. Gavrilova and A. Alvarez, “Cerebrolysin in the therapy of mild cognitive impairment and dementia due to Alzheimer’s disease: 30 years of clinical use,” *Medicinal Research Reviews*, vol. 41, no. 5. John Wiley and Sons Inc, pp. 2775–2803, Sep. 01, 2021. doi: 10.1002/med.21722.
- [16] M. Anders and R. Červený, “DEPRESE Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře,” 2023.
- [17] M. Neațu, A. Covaliu, I. Ioniță, A. Jugurt, E. I. Davidescu, and B. O. Popescu, “Monoclonal Antibody Therapy in Alzheimer’s Disease,” *Pharmaceutics*, vol. 16, no. 1. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Jan. 01, 2024. doi: 10.3390/pharmaceutics16010060.
- [18] C. Song *et al.*, “Immunotherapy for Alzheimer’s disease: targeting β -amyloid and beyond,” *Translational Neurodegeneration*, vol. 11, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s40035-022-00292-3.
- [19] I. Vecchio, L. Sorrentino, A. Paoletti, R. Marra, and M. Arbitrio, “The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer’s Disease,” *Journal of Central Nervous System Disease*, vol. 13. SAGE Publications Inc., 2021. doi: 10.1177/11795735211029113.
- [20] K. Sharma, “Cholinesterase inhibitors as Alzheimer’s therapeutics (Review),” *Molecular Medicine Reports*, vol. 20, no. 2. Spandidos Publications, pp. 1479–1487, 2019. doi: 10.3892/mmr.2019.10374.

- [21] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry, and J. L. Sussman, "Acetylcholinesterase: From 3D structure to function," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 187, no. 1–3, pp. 10–22, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
- [22] Q. Li, H. Yang, Y. Chen, and H. Sun, "Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 132. Elsevier Masson SAS, pp. 294–309, 2017. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.062.
- [23] M. B. Olovi, D. Z. Krsti, T. D. Lazarevi-Pati, A. M. Bondi, and V. M. Vasi, "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology," *Current Neuropharmacology*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, 2013, doi: 10.2174/1570159X11311030006.
- [24] A. A. N. de Paula *et al.*, "New potential AChE inhibitor candidates," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, no. 9, pp. 3754–3759, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.ejmech.2009.03.045.
- [25] J. Korabecny *et al.*, "Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine-new tacrine derivate with cholinergic properties," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 21, no. 21, pp. 6563–6566, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.bmcl.2011.08.042.
- [26] L. L. Fershtat and N. N. Makhova, "1,2,5-Oxadiazole-Based High-Energy-Density Materials: Synthesis and Performance," *ChemPlusChem*, vol. 85, no. 1. Wiley-VCH Verlag, pp. 13–42, Jan. 01, 2020. doi: 10.1002/cplu.201900542.
- [27] S. S. De, M. P. Khambete, and M. S. Degani, "Oxadiazole scaffolds in anti-tuberculosis drug discovery," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 29, no. 16. Elsevier Ltd, pp. 1999–2007, Aug. 15, 2019. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.06.054.
- [28] A. Siwach and P. K. Verma, "Therapeutic potential of oxadiazole or furadiazole containing compounds," *BMC Chemistry*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2020. doi: 10.1186/s13065-020-00721-2.
- [29] K. Biernacki, M. Daško, O. Ciupak, K. Kubiński, J. Rachon, and S. Demkowicz, "Novel 1,2,4-oxadiazole derivatives in drug discovery," *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 6. MDPI AG, Jun. 01, 2020. doi: 10.3390/ph13060111.

- [30] A. P. Grekov and E. P. Nesynov, *Journal of General Chemistry of the USSR*, vol. 31, pp. 1037–1039, 1961.
- [31] DAHL BJARNE H, PETERS DAN, OLSEN GUNNAR M, TIMMERMANN DANIEL B, and JOERGENSEN SUSANNE, “OXADIAZOLE AND THIADIAZOLE COMPOUNDS AND THEIR USE AS NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR MODULATORS.,” WO2008049864, 2008, A1.
- [32] Z. Shang, “Oxidative Cyclization of Aromatic Aldehyde *N*-Acylhydrazones by bis(Trifluoroacetoxy)iodobenzene,” *Synthetic Communications*, vol. 36, no. 20, pp. 2927–2937, Oct. 2006, doi: 10.1080/00397910600773650.
- [33] Z. Shang, Q. Chu, and S. Tan, “Metal-Free Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles from *N*’-(Arylmethyl)hydrazides or 1-(Arylmethyl)-2-(arylmethylene)hydrazines,” *Synthesis (Stuttg)*, vol. 47, no. 07, pp. 1032–1040, Feb. 2015, doi: 10.1055/s-0034-1379974.
- [34] M. T. H. Khan, M. I. Choudhary, K. M. Khan, M. Rani, and Atta-ur-Rahman, “Structure-activity relationships of tyrosinase inhibitory combinatorial library of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole analogues,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 3385–3395, May 2005, doi: 10.1016/j.bmc.2005.03.012.
- [35] P. S. Thacker, A. Angeli, O. S. Argulwar, P. L. Tiwari, M. Arifuddin, and C. T. Supuran, “Design, synthesis and biological evaluation of coumarin linked 1,2,4-oxadiazoles as selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors,” *Bioorganic Chemistry*, vol. 98, May 2020, doi: 10.1016/j.bioorg.2020.103739.
- [36] Z. Wang *et al.*, “Synthesis and Properties of Energetic 1,2,4-Oxadiazoles,” *European Journal of Organic Chemistry*, vol. 2015, no. 34, pp. 7468–7474, Dec. 2015, doi: 10.1002/ejoc.201501056.
- [37] SIMPSON DAVID, KISTER JEREMY, LI MEI, WEI BIN, and GIFFORD JAMES, “AUXINIC HERBICIDES AND METHODS OF USE THEREOF,” WO2022170075, 2022, A1.
- [38] F. S. Cunha, J. M. R. Nogueira, and A. P. De Aguiar, “Synthesis and antibacterial evaluation of 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole derivatives,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 29, no. 11, pp. 2405–2416, 2018, doi: 10.21577/0103-5053.20180118.

- [39] N. H. Hounghbedji *et al.*, “Novel Inhibitors of Acetyl- and Butyrylcholinesterase Derived from Benzohydrazides: Synthesis, Evaluation and Docking Study,” *Pharmaceuticals*, vol. 16, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/ph16020172.
- [40] M. Krátký, J. Vinšová, E. Novotná, J. Mandíková, F. Trejtnar, and J. Stolaříková, “Antibacterial activity of salicylanilide 4-(trifluoromethyl)benzoates,” *Molecules*, vol. 18, no. 4, pp. 3674–3688, Apr. 2013, doi: 10.3390/molecules18043674.
- [41] M. Krátký, K. Konečná, K. Brokešová, J. Maixnerová, F. Trejtnar, and J. Vinšová, “Optimizing the structure of (salicylideneamino)benzoic acids: Towards selective antifungal and anti-staphylococcal agents,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 159, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105732.
- [42] G. Kahlmeter *et al.*, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. 6. Blackwell Publishing Ltd, pp. 501–503, 2006. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x.
- [43] M. Krátký *et al.*, “Improving the antimicrobial activity of old antibacterial drug mafenide: Schiff bases and their bioactivity targeting resistant pathogens,” *Future Medicinal Chemistry*, vol. 15, no. 3, pp. 255–274, Feb. 2023, doi: 10.4155/fmc-2022-0259.

8 SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
ApoE4	Apolipoprotein E4
ATCC	American Type Culture Collection
ATCh	Acetylthiocholin
BTCh	Butyrylthiocholin
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CA	<i>Candida albicans</i>
CCM	Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)
CFU	Colony forming units (jednotky tvořící kolonie)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	Deuterovaný dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
EC	<i>Escherichia coli</i>
EEG	Elektroencefalogram
EF	<i>Enterococcus faecalis</i>
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol hydrát

CHE	Cholinesterázy
IgG1	Imunoglobulin G1
MAO	Monoaminoxidáza
MF	Mobilní fáze
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MMSE	Mini Mental State Exam (krátký test kognitivních funkcí)
MRSA	Methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PAS	Periferní aniontové místo
R_f	Retenční faktor
RVO	Rotační vakuová odparka
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
THF	Tetrahydrofuran
TI	<i>Trichophyton interdigitale</i>
TLC	Tenkovrstvá chromatografie

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Hydrolýza acetylcholinu	14
Obrázek 2	Struktura takrinu	15
Obrázek 3	Struktura donepezilu	15
Obrázek 4	Struktura rivastigminu.....	15
Obrázek 5	Struktura galantaminu	16
Obrázek 6	Struktura huperzinu A	16
Obrázek 7	Struktura fyzostigminu a jeho derivátů.....	17
Obrázek 8	Příklad struktury kardanolu.....	17
Obrázek 9	Struktura 7-methoxytakrinu	18
Obrázek 10	Struktura ladostigilu a fukoxanthinu.....	19
Obrázek 11	Izomerní struktury oxadiazolů	19
Obrázek 12	Struktura raltegraviru	20
Obrázek 13	Struktura zibotentanu	20
Obrázek 14	Struktury nesapidilu a tiodazosinu.....	21
Obrázek 15	Struktura furamizolu	21
Obrázek 16	Struktury oxolaminu, butalaminu, plekonarilu, atalurenu a fasiplonu.....	22
Obrázek 17	Schéma cílových sloučenin připravovaných v rámci diplomové práce	23
Obrázek 18	Metoda 1 – Schéma přípravy sloučeniny EF01, THF – tetrahydrofuran; Metoda 2 – Schéma přípravy sloučenin EF03, EF04, EF05; HOBt – 1-hydroxybenzotriazol hydrát; EDC.HCl – N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid; DMF – N,N-dimethylformamid; on – over night (přes noc).....	25
Obrázek 19	N'-(4-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF01).....	27
Obrázek 20	N'-(3-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF03).....	28
Obrázek 21	N'-(2-Nitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF04)	29
Obrázek 22	N'-(2,4-Dinitrobenzoyl)nikotinohydrazid (EF05)	30
Obrázek 23	Schéma syntézy chinolin-5-karbohydrazidu; on – over night (přes noc)	31
Obrázek 24	N'-(3-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF09)	33
Obrázek 25	N'-(2-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF10)	34
Obrázek 26	N'-(4-Nitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF14)	35
Obrázek 27	N'-(2,4-Dinitrobenzoyl)chinolin-5-karbohydrazid (EF20)	36

Obrázek 28 Schéma přípravy 1,3,4-oxadiazolů; TsCl – p-toluensulfonylchlorid; DCM – dichlormethan; RT – room temperature (laboratorní teplota)	37
Obrázek 29 2-(4-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF02)	38
Obrázek 30 2-(3-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF06)	39
Obrázek 31 2-(2-Nitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF07)	40
Obrázek 32 2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF13)	41
Obrázek 33 2-(3-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF11)	42
Obrázek 34 2-(2-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF12)	43
Obrázek 35 2-(4-Nitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF15)	44
Obrázek 36 2-(2,4-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,3,4-oxadiazol (EF21)	45
Obrázek 37 Syntéza amidoximů (EE1, EE2) a 1,2,4-oxadiazolů (EE3, EE4, EE5, EE6); DIPEA – N,N-diisopropylethylamin; THF – tetrahydrofuran; CDI – 1,1'-karbonyldiimidazol; DMSO – dimethylsulfoxid; RT – room temperature (laboratorní teplota)	46
Obrázek 38 N'-Hydroxy-3,5-dinitrobenzimidamid (EE1)	47
Obrázek 39 N'-Hydroxychinolin-5-karboximidamid (EE2)	48
Obrázek 40 3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE3)	49
Obrázek 41 5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(pyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE4)	50
Obrázek 42 3-(3,5-Dinitrofenyl)-5-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE5)	51
Obrázek 43 5-(3,5-Dinitrofenyl)-3-(chinolin-5-yl)-1,2,4-oxadiazol (EE6)	52

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výsledky inhibice CHE	60
Tabulka 2 Výsledky antimykobakteriální aktivity	62
Tabulka 3 Výsledky antibakteriální aktivity	63
Tabulka 4 Výsledky antifungální aktivity	64