

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Oxadiazoly ako potenciálne liečivá III.**

Diplomová práca

Michaela Lukáčová

PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

*„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“*

Michaela Lukáčová

**Diplomová práca vznikla za podpory grantu SVV 260 401.**

*Chcela by som sa poďakovať za odbornú pomoc všetkým, ktorí sa podieľali na vzniku tejto práce. V prvom rade by som rada poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce, PharmDr. Marte Kučerovej, Ph.D., za jej rady, pomoc a všetok čas, ktorý mi pri vzniku tejto práce venovala.*

*Ďalšie poďakovanie patrí doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za zmeranie a interpretáciu NMR spektier, pani D. Štěpánovej za prevedenie elementárnych analýz, doc. PharmDr. R. Kučerovi, Ph.D. za prevedenie HPLC, RNDr. K. Konečnej, Ph.D., PharmDr. O. Jand'ourkovi, Ph.D. a pani I. Dufkovej za testovanie antibakteriálnej a antifungálnej aktivity a PharmDr. O. Jand'ourkovi, Ph.D. za testovanie antimykobakteriálnej aktivity proti *M. smegmatis* a *M. aurum*.*

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Názov diplomovej práce:** Oxadiazoly ako potenciálne liečivá III.

**Študent:** Michaela Lukáčová

**Školiteľ:** PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

V teoretickej časti tejto práce je zhrnutá biologická aktivita 1,2,4-oxadiazolov, zameraná primárne na ich antimykobakteriálne, antibakteriálne a antifungálne pôsobenie. 1,2,4-Oxadiazoly sú látky s mnohými biologickými účinkami, preto je spomenutá aj ich antioxidantná, protizápalová, analgetická a cytostatická aktivita.

Z teoretickej časti vyplýva, že 1,2,4-oxadiazoly sú látky, ktoré majú veľký potenciál pre využitie v liečbe nielen tuberkulózy, ale aj mnohých iných ochorení. Experimentálna časť je teda zameraná na syntézu 5-substituovaných 3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazolov a následné vyhodnotenie ich antibakteriálnej, antifungálnej a najmä antimykobakteriálnej aktivity. V tejto časti sú tiež uvedené postupy použité pre syntézu týchto látok. Celkovo bolo nasyntetizovaných deväť látok, z toho šesť derivátov pripravených reakciou *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu s rôznymi anhydridmi karboxylových kyselín, tri deriváty pripravené reakciou *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu s karboxylovými kyselinami. Reakciami *N'*-hydroxypyrazin-2-karbamoylchloridu s nitrilmi, ani reakciou nitrilu s aldehydom prebiehajúcou v mikrovlnnom reaktore sa nepodarilo pripraviť príslušné 1,2,4-oxadiazoly. Okrem syntézy oxadiazolových derivátov boli realizované aj reakcie za účelom získania methanon-oximov. Tieto reakcie nevedli k vzniku očakávaných produktov.

Šesť z pripravených látok nebolo doposiaľ popísaných v literatúre. Tri deriváty boli charakterizované. Všetky látky boli charakterizované teplotou topenia, IČ a NMR spektrami. Čistota bola u tuhých látok overená elementárnou analýzou a u kvapalných látok pomocou HPLC.

Látky boli testované *in vitro* na antimykobakteriálnu, antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu. Tri látky mali stredne dobrú inhibičnú aktivitu na vybrané kmene mykobaktérií, z nich jedna látka mala zároveň stredne dobrú antifungálnu aktivitu. Žiadna z testovaných zlúčenín nemala významnú aktivitu voči ostatným bakteriálnym kmeňom, látky pôsobili selektívne na mykobakterie.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Title of diploma thesis:** Oxadiazoles as potential drugs III.

**Student:** Michaela Lukáčová

**Supervisor:** PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Theoretical part of this diploma thesis summarises biological activity of 1,2,4-oxadiazoles, while focusing primarily on their antimycobacterial, antibacterial and antifungal effects. 1,2,4-Oxadiazoles are compounds with versatile biological applications, therefore their antioxidant, antiinflammatory, analgesic and cytostatic activity is also mentioned.

Based on the facts in the theoretical part, it is perceptible, that 1,2,4-oxadiazoles are substances with great therapeutical potential not only for the treatment of tuberculosis, but also many other diseases. Thus, the experimental part of this work is focused on the synthesis of 5-substituted 3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazoles followed by evaluation of their antibacterial, antifungal and most importantly antimycobacterial activity. Synthetic procedure for each compound is also included. Nine compounds were successfully synthesized, six of them were prepared by reaction of *N'*-hydroxypyrazine-2-carboximidamide with different carboxylic acid anhydrides and three of them by reaction of *N'*-hydroxypyrazine-2-carboximidamide with different carboxylic acids. Reactions using *N'*-hydroxypyrazine-2-carbimidoylchloride and nitriles as reactants and reaction using nitrile and aldehyde performed under microwave irradiation did not lead to expected 1,2,4-oxadiazoles. Another set of reactions was performed under microwave irradiation with the aim to obtain methanone-oximes. Neither of these reactions lead to expected products.

Six of the synthesized compounds have not been reported in literature yet and are therefore considered to be novel. The other three compounds have already been described. All the prepared compounds have been characterized by their melting points, IR and NMR spectra. The purity of solid compounds has been verified with elemental analysis and the purity of liquid ones with HPLC.

All the prepared compounds were tested for their *in vitro* antimycobacterial, antibacterial and antifungal activity. Three compounds exhibited moderate antimycobacterial activity against certain mycobacterial strains. One of these compounds exhibited also moderate antifungal activity. None of the tested compounds exhibited relevant activity against other bacterial strains, compounds were active selectively against mycobacteria.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod a cieľ práce</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická časť</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Antimikróbna aktivita</b> .....	<b>9</b>
2.1.1	Antimykobakteriálna aktivita .....	9
2.1.2	Antibakteriálna aktivita .....	15
2.1.3	Antifungálna aktivita .....	21
<b>2.2</b>	<b>Iné účinky 1,2,4-oxadiazolov</b> .....	<b>23</b>
2.2.1	Antioxidačné účinky .....	23
2.2.2	Protizápalové účinky .....	25
2.2.3	Cytostatické účinky .....	26
<b>3</b>	<b>Experimentálna časť</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemická časť</b> .....	<b>28</b>
3.1.1	Syntéza medziproduktov .....	30
3.1.2	Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karboximidamidu a anhydridov karboxylových kyselín .....	31
3.1.3	Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karboximidamidu a karboxylových kyselín .....	38
3.1.4	Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karbimidoylchloridu a karbonitrilov .....	42
3.1.5	Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karbonitrilu a aldehydov .....	44
3.1.6	Syntéza methanon-oximov z karbimidoylchloridu a nasýtených heterocyklov .....	45
<b>3.2</b>	<b>Biologická časť</b> .....	<b>47</b>
3.2.1	Vyhodnotenie antimykobakteriálnej aktivity .....	47
3.2.2	Vyhodnotenie antibakteriálnej aktivity .....	51
3.2.3	Vyhodnotenie antifungálnej aktivity .....	53
<b>4</b>	<b>Diskusia</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Záver</b> .....	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Zoznam použitej literatúry</b> .....	<b>64</b>

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

MDR-TB = multirezistentná tuberkulóza

XDR-TB = extenzívne rezistentná tuberkulóza

SAR = vzťah medzi štruktúrou a aktivitou

3D-QSAR = trojdimenzionálne kvantitatívne vyhodnotenie vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou

ETH = ethionamid

EthA = Baeyerova-Villigerova monooxygenáza

EthR = transkripčný represor potláčajúci expresiu EthA

MRSA = meticilin-rezistentný *Staphylococcus aureus*

VRSA = vankomycín-rezistentný *Staphylococcus aureus*

VRE = vankomycín-rezistentný *Enterococcus faecium*

ESBL = širokospektré betalaktamázy

MIC = minimálna inhibičná koncentrácia

Nrf2 = nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2

ARE = antioxidant response element

ALT = alanin-aminotransferáza

AST = aspartát-aminotransferáza

NSAID = nesteroidné protizápalové liečivá

HDAC = histon deacetyláza

SAHA = vorinostat

CDI = 1,1'-karbonyldiimidazol

DMF = dimethylformamid

DMSO = dimethylsulfoxid

CDCl<sub>3</sub> = deuterovaný chloroform

TEA = triethylamín

# 1 ÚVOD A CIEĽ PRÁCE

Tuberkulóza, ochorenie spôsobené mykobaktériou *Mycobacterium tuberculosis*, je jedným z desiatich najčastejších príčin úmrtí vo svete. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) sa v roku 2017 toto ochorenie objavilo až u 10 miliónov ľudí a smrteľným sa stalo pre 1,3 milión ľudí celosvetovo. Najväčšou záťažou je hlavne pre rozvojové krajiny Afriky a Ázie, v ktorých sa z uvedeného počtu vyskytuje až 87 % prípadov. [1] V Českej republike bolo za rok 2017 hlásených 505 prípadov nakazených obyvateľov a 25 úmrtí. [2] Na Slovensku bolo za rok 2017 evidovaných 249 prípadov, z toho najviac prípadov bolo zaznamenaných na východnom Slovensku. [3] Z dlhodobého hľadiska má ale tuberkulóza v Česku aj na Slovensku klesajúci trend.

Čo ale ostáva problémom u nás, aj na celom svete, je výskyt tzv. multirezistentných kmeňov *M. tuberculosis*, ktoré sú rezistentné na liečbu v súčasnosti najúčinnjšími antituberkulotikami 1. línie – rifampicínom a isoniazidom, a výskyt tzv. extenzívne rezistentných kmeňov, ktoré vykazujú rezistenciu aj aspoň na jedno fluorochinolónové antibiotikum a niektoré injekčne podávané antituberkulotikum 2. línie (amikacin, kanamycin...). [1] Rastúca rezistencia mykobaktérií je dôvodom pre hľadanie nových, účinných liečiv, čím sa zaoberá aj Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy a je témou aj tejto diplomovej práce.

Táto diplomová práca je zameraná na syntézu rôzne substituovaných 1,2,4-oxadiazolov a zmieňuje aj syntézu methanon-oximov. Tým naväzuje na diplomové práce iných študentov [4, 5, 6, 7].

1,2,4-Oxadiazoly sú heterocyklické zlúčeniny, ktoré majú široké spektrum biologických účinkov. To zahŕňa účinky antibakteriálne, antimykobakteriálne, antifungálne, antiprotozoálne, antiastmatické, protinádorové, antioxidačné, analgetické, protizápalové. Mnohé z týchto účinkov bližšie popísala *Dzámová* [7].

Táto diplomová práca popisuje biologickú aktivitu 1,2,4-oxadiazolov, sumarizuje poznatky najmä z obdobia 2015–2019, staršie práce sú spomenuté v nadväznosti na pokračujúci výskum. Zameriava sa hlavne na ich antimikróbne pôsobenie, teda antimykobakteriálnu, antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu, no spomenuté sú aj iné významné účinky týchto látok.

Cieľom tejto práce je zhodnotenie biologickej aktivity látok s 1,2,4-oxadiazolovým kruhom a syntéza 5-substituovaných 3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazolov s následným vyhodnotením ich antibakteriálnej a antifungálnej aktivity *in vitro* voči mykobaktériám a širokému spektru ďalších bakteriálnych a fungálnych kmeňov.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Antimikróbna aktivita

#### 2.1.1 Antimykobakteriálna aktivita

Tuberkulóza je závažné ochorenie, ktorého liečba býva náročná a zdĺhavá. V súčasnosti existujú v terapii tuberkulózy dve línie liečiv. Do 1. línie patrí isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol. Na zabránenie vzniku rezistencie sa zvyčajne užívajú v kombinácii, pričom štandardná dĺžka liečby je 6 mesiacov. [8]

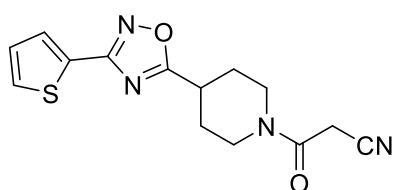
Medzi liečivá 2. línie patria ethionamid, fluorochinolonové a aminoglykozidové antibiotiká. [8] Tieto liečivá sú využívané v terapii menej často a len u pacientov, u ktorých sa rozvinula multirezistencia (MDR-TB) alebo extenzívna rezistencia (XDR-TB), nakoľko sú tieto látky menej účinné ako liečivá 1. línie a majú toxickejšie nežiadúce účinky pre organizmus. Nevýhodou je aj dĺžka liečby, ktorá sa predlžuje na 2 až 4 roky. Spolu s množstvom nežiadúcich účinkov, ktoré sprevádzajú liečbu, to má negatívny dopad na compliance pacienta. [9, 10, 11, 12] Rozvoj rezistencie na existujúce liečivá vedie k mnohým komplikáciám v terapii tuberkulózy, a to je dôvodom hľadania nových, účinnejších antituberkulotík.

Ako jedna z vhodných stratégií sa javí využitie tzv. booster drugs. Jedná sa o látky, ktoré sami o sebe antimykobakteriálnu aktivitu nevykazujú, no výrazne zvyšujú efekt ethionamidu a minimalizujú jeho toxicitu.

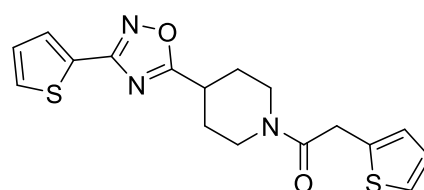
Ethionamid (ETH) je v súčasnosti považovaný za základné liečivo 2. línie antituberkulotík, ktoré sa využíva v liečbe MDR-TB. Je účinné na viac ako 80 % multirezistentných kmeňov *M. tuberculosis*. Jeho hlavnou nevýhodou je pomerne nízky terapeutický index, nakoľko dávky potrebné pre inhibíciu rastu *M. tuberculosis* vedú k závažným vedľajším účinkom ako sú gastrointestinálne ťažkosti, hepatitída a mentálne poruchy. Tieto nežiadúce účinky bývajú príčinou non-compliance pacienta, čím sa liečba ochorenia komplikuje. [9, 10]

ETH je proliečivo, ktoré sa aktivuje metabolizáciou mykobaktériami. Kľúčovú úlohu zohráva mykobakteriálny enzým Baeyerova-Villigerova monooxygenáza označovaná ako EthA. Metabolizácia ETH týmto enzýmom vedie k vzniku aduktu s nikotínamidadenindinukleotidom (NAD), ktorý inhibuje NADH-dependentnú reduktázu. Tá je nevyhnutná k biosyntéze mykolových kyselín, ktoré tvoria základ bunkovej steny mykobaktérií. Touto metabolickou cestou vedie ETH k zastaveniu syntézy mykolových kyselín, a tým k narušeniu integrity mykobakteriálnej bunkovej steny. Transkripcia EthA je potláčaná transkripčným represorom EthR. [9, 10,12]

Inhibícia EthR represoru by mala viesť k zvýšenej expresii enzýmu EthA, čím by sa zvýšila citlivosť *M. tuberculosis* voči ETH. Na základe tejto hypotézy Flipo a kol. [9] syntetizovali sériu potenciálnych EthR inhibítorov so štruktúrou 2-thienyl-1,2,4-oxadiazolu. Z pôvodných 131 zlúčenín bol po optimalizácii výber zúžený na dve hlavné látky označené ako BDM31343 a BDM31381 (**Obr. 1** a **Obr. 2**). Aktivita obidvoch látok bola otestovaná na myšiach infikovaných *M. tuberculosis*, ktorým sa podával ETH v kombinácii s nasyntetizovanými inhibítormi EthR. Po porovnaní výsledkov liečby s podávaním samotného ETH a s inhibítormi EthR bolo preukázané, že tieto látky zvyšujú efekt ETH. Podávanie BDM31343 trojnásobne zvyšuje účinok ETH. [8]



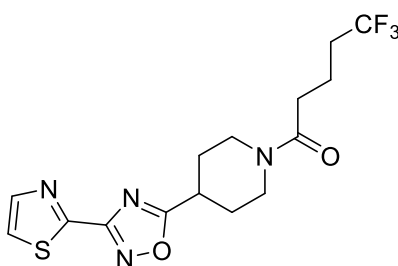
**Obr. 1** BDM31343



**Obr. 2** BDM31381

Látka BDM31381 vykazovala *in vitro* silnejší účinok na aktiváciu ETH, no jej biologická dostupnosť bola nízka. Z tohto hľadiska sa javilo ako výhodnejšie použitie látky BDM31343 kvôli jej lepšiemu farmakokinetickému profilu, a to aj napriek jej nižšej aktivite *in vitro*. Preto bola táto látka použitá ako tzv. vodcovská štruktúra, ktorej modifikáciou bolo pripravených 81 derivátov. [9]

Na túto štúdiu naväzuje ďalšia, opäť vedená Flipom a kol. [10], ktorej cieľom bola optimalizácia farmakokinetického profilu objavenej látky BDM31343. Tento proces viedol k identifikácii novej molekuly označenej ako BDM41906 (**Obr. 3**), s lepšou biologickou dostupnosťou po perorálnom podaní.



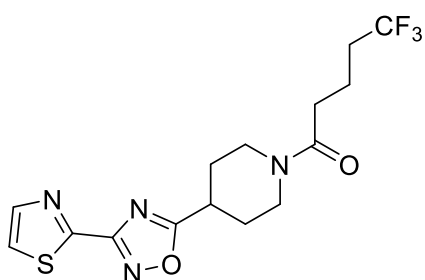
**Obr. 3** BDM41906

Pri hľadaní tejto molekuly boli realizované modifikácie 1,2,4-oxadiazolového kruhu aj 2-thienylového kruhu látky BDM31343. Zámena 1,2,4-oxadiazolového cyklu za iný heterocyklus nevedla k objaveniu účinnejších látok. Práve naopak, zámena za 1,3-thiazol, pyrazol, 1,3,4-oxadiazol, isoxazol a pyrazolon viedla k látkam s výrazne nižšou alebo minimálnou aktivitou. Jedine zamenou za 1,3-thiazol vznikla látka, ktorá si

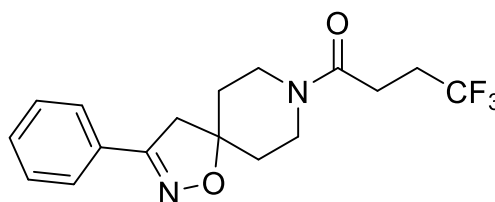
zachovala určitú aktivitu, no v porovnaní s 1,2,4-oxadiazolovým kruhom mala 8-krát nižší účinok. 1,2,4-Oxadiazolové jadro je teda nevyhnutné pre vytvorenie väzby s transkripčným represorom EthR. [10]

Táto skupina autorov sa venovala výskumu tejto látky aj v nasledujúcich rokoch. Význam zlúčeniny dokazuje pokračujúci preklinický výskum [11], v ktorom sa autori zaoberali využitím kombinácie ETH s „booster“ molekulou BDM41906 vo forme biodegradabilných polymérnych nanočastíc aplikovaných do pľúc. Táto kombinácia bola testovaná na myšiach infikovaných *M. tuberculosis*. Výhodou tejto aplikácie je lokálne pôsobenie v pľúcach, ktoré vo väčšine prípadov bývajú hlavným miestom infekcie. Samotný orálne podávaný ETH býva pomerne zle znášaný, hlavne z dôvodu gastrointestinálnych ťažkostí. Cílená distribúcia ETH v kombinácii s BDM41906 umožňuje minimalizáciu systémových nežiadúcich účinkov, zníženie dávky a tiež frekvencie dávkovania ETH a zvýšenie biologickej dostupnosti liečiva v pľúcach. Už dvojtýždňová liečba touto kombináciou viedla k 1000-násobnému poklesu v počte prítomných mykobaktérií oproti neliečeným myšiam. Ako už bolo spomínané, naproti tomu súčasná liečba tuberkulózy trvá minimálne 6 mesiacov, v prípade MDR-TB aj roky. Do budúcnosti má táto liečba významný potenciál.

Potenciál týchto inhibítorov potvrdzujú aj ďalšie naväzujúce štúdie [13], ktorých cieľom bolo nájsť nové inhibítory EthR odvodených od 1,2,4-oxadiazolu. Zámenou oxadiazolu a piperidínu v molekule BDM41906 za spiroisoxazolin (**Obr. 4** a **Obr. 5**) vznikla zlúčenina, ktorá úplne stratila schopnosť viazať sa na EthR, no napriek tomu výrazne potencovala antimykobakteriálnu aktivitu ETH.



**Obr. 4** BDM41906



**Obr. 5** SMART-420

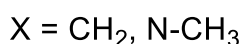
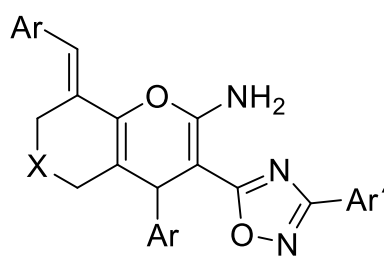
Pri skúmaní mechanizmu účinku tejto látky, označenej ako SMART-420 (Small Molecule Aborting Resistance) autori zistili, že aktivuje alternatívnu cestu metabolizácie ETH. Dokáže zvrátiť už vzniknutú rezistenciu u kmeňov mykobaktérií s mutáciou enzýmu EthA. Z hľadiska mechanizmu účinku u takto mutovaných mykobaktérií je kombinácia ETH a BDM41906 neúčinná. SMART-420 pôsobí na tieto kmene, pretože aktivuje ETH odlišnou metabolickou cestou. [13] K rovnakému záveru dospeli aj v ďalšej

štúdiu [14], v ktorej zisťovali mechanizmus účinku tejto látky a sledovali interakciu medzi SMART-420 a represorom EthR2, na ktorý pôsobí.

V súčasnosti, BDM41906 a SMART-420 patria medzi dve najvýznamnejšie molekuly zo skupiny inhibítorov EthR. Tieto objavy inšpirovali aj ďalších vedcov, napr. Tatum a spol. [15], ktorí využili *in silico* screeningové metódy s cieľom nájdania ďalších inhibítorov EthR.

Okrem potenciácie účinku iných antituberkulotík, niektoré látky so štruktúrou 1,2,4-oxadiazolu sami vykazujú účinok na potlačenie rastu *M. tuberculosis*. Jedná sa napr. o hybridné molekuly, v ktorých je 1,2,4-oxadiazolové jadro prepojené s iným cyklom, väčšinou takisto vykazujúcim určitú antimykobakteriálnu aktivitu.

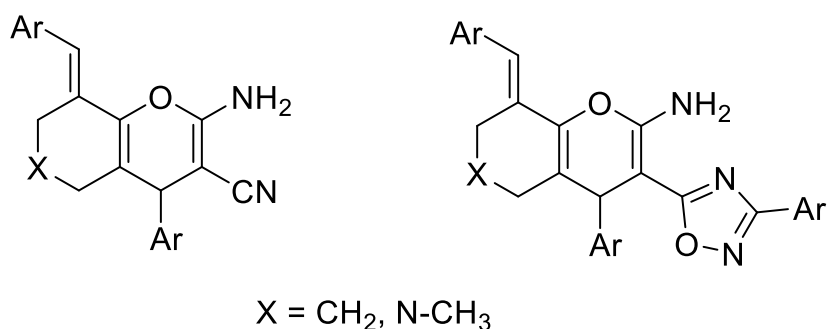
Ako potenciálne vodcovské štruktúry vykazujúce dobrú *in vitro* antimykobakteriálnu aktivitu sa javia hybridy 1,2,4-oxadiazolu s pyranopyridínom alebo chroménom (**Obr. 6**). Sériu týchto látok syntetizovali Kumar a kolektív [16].



**Obr. 6** Základná štruktúra hybridných molekúl 1,2,4-oxadiazolu a pyranopyridínu alebo chroménu

Autori predpokladali, že 1,2,4-oxadiazolový kruh je štruktúra, ktorá je schopná sa viazať na širokú škálu cieľových proteínov, čo potvrdzuje ich široké spektrum účinku, má teda významný potenciál. Samotné pyranopyridínové deriváty, ktoré autori tejto štúdie syntetizovali v predchádzajúcich rokoch, mali dobrú antimykobakteriálnu aktivitu [17]. V porovnaní s týmito látkami, hybridné molekuly vykazovali vyššiu aktivitu *in vitro*. Väčšina hybridných molekúl vykazovala vyššiu aktivitu proti *M. tuberculosis* oproti súčasne využívaným liečivám, jedna látka bola 1,2-krát účinnejšia ako isoniazid. [16]

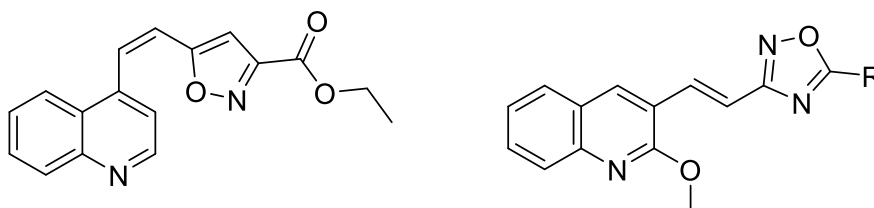
Vyhodnotenie vzťahu medzi štruktúrou daných látok a ich aktivitou preukázalo, že nahradenie nitrilovej skupiny v pôvodných molekulách za 1,2,4-oxadiazolových kruh vedie k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity (**Obr. 7**). [16]



**Obr. 7** Záměna nitrilovej skupiny v pôvodnej molekule (vľavo) za 1,2,4-oxadiazolový kruh (vpravo)

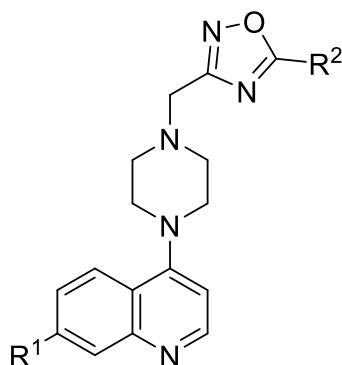
Z novších molekúl vykazujú dobrú aktivitu hybridy chinolínu a 1,2,4-oxadiazolu. Týmito látkami sa zaoberali Jain a kol. [18] a tiež Shruthi a kol. [19]. Spojenie týchto dvoch štruktúr opäť vychádza z ich aktivity. Chinolinové zlúčeniny majú široké spektrum účinku – to zahŕňa protizápalové, protinádorové, antihypertenzívne, antibakteriálne, antimalarické a anti-HIV pôsobenie. [19]

Mao a kol. [20] syntetizovali chinolin-isoxazolové hybridné molekuly s dobrou inhibičnou aktivitou voči *M. tuberculosis* (**Obr. 8**, vľavo). Modifikáciou chinolin-isoxazolového jadra vytvorili Jain a kol. [18] 19 hybridných látok s chinolin-oxadiazolovým cyklom (**Obr. 8**, vpravo). Zámenou isoxazolovej štruktúry za 1,2,4-oxadiazol došlo k zvýšeniu metabolickej stability a zlepšeniu biologickej dostupnosti molekuly. Zamenená bola aj esterová skupina z pôvodnej molekuly za arylovú, heteroarylovú alebo alifatickú skupinu (**Obr. 8**, subst. R), nakoľko esterové väzby sú v organizme ľahko rozštiepiteľné esterázami, čo vedie k nízkej metabolickej stabilite látky.



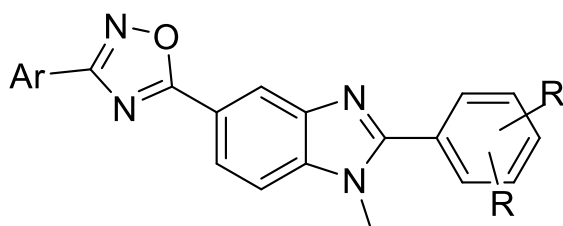
**Obr. 8** Chinolin-isoxazolové hybridné zlúčeniny (vľavo), od ktorých boli odvodené chinolin oxadiazolové hybridy (vpravo).  
Vpravo 3-[2-(Chinolin-2-yl)-vinyl]-1,2,4-oxadiazol

Štyri látky z celej série molekúl, ktoré syntetizovali Shruthi a kol. (**Obr. 9**), sú vhodnými vodcovskými štruktúrami, ktoré budú ďalej testované na zvieracích modeloch infikovaných *M. tuberculosis*. Vykazujú veľmi dobrú aktivitu *in vitro*, majú vhodný farmakokinetický profil a sú metabolicky stabilné. Výhodou týchto látok je ich vysoká selektivita – majú úzke spektrum pôsobnosti, podobne ako isoniazid. Všetky štyri molekuly sú neaktívne voči grampozitívnym aj gramnegatívnym baktériám, pôsobia špecificky len na *M. tuberculosis*. [19]



**Obr. 9** Chinolin-oxadiazolové hybridy, ktoré syntetizovali Shruthi a kol.  
5-Subst.-3-[(4-(7-subst.chinolin-4-yl)-piperazin-1-yl)methyl]-1,2,4-oxadiazol

Shruthi a kolektív syntetizovali aj iné hybridné molekuly, a to s benzimidazolovým jadrom (**Obr. 10**). [21] Látky s benzimidazolom majú antivírusové, protinádorové, anthelmintické, antiprotozoálne, antihypertenzívne a mnohé iné aktivity. Niektoré látky so štruktúrou benzimidazolu sa dnes využívajú v klinickej praxi, napr. albendazol a mebendazol ako anthelmintiká alebo omeprazol a pantoprazol ako inhibítory protónovej pumpy.



R= halogén (Cl, F)

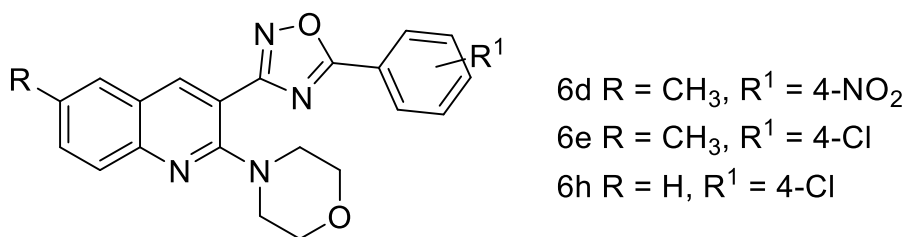
**Obr. 10** Štruktúra benzimidazol-oxadiazolovej hybridnej molekuly.  
Fenylový zvyšok substituovaný dvoma halogénmi v rôznych polohách.

Látky boli otestované nielen na ich antimykobakteriálnu aktivitu, ale aj ich antibakteriálne pôsobenie proti *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* a antifungálnu aktivitu proti *Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*. Z dvadsiatich pripravených molekúl vykazovali výbornú antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu dve látky, ktoré mali dokonca vyšší účinok oproti štandardne používanému antibiotiku ciprofloxacínu a antimykotiku flukonazolu. Jedna z týchto látok vykazovala významnú aktivitu aj voči *M. tuberculosis* s účinkom až štyrikrát vyšším oproti isoniazidu a streptomycínu. Všetky pripravené látky mali absorpciu po perorálnom podaní vyššiu ako 90 % a nízku toxicitu na ľudské bunky, čo z nich robí veľmi sľubné molekuly. Na základe SAR analýzy bolo zistené, že zavedením halogénu sa výrazne zvýši antimykobakteriálna, antibakteriálna aj antifungálna aktivita látok. [21]

## 2.1.2 Antibakteriálna aktivita

Obdobne ako u tuberkulózy, dôvodom hľadania nových antimikróbných liečiv, ktoré by pôsobili na široké spektrum baktérií, je nárast rezistencie na v súčasnosti využívané antibiotiká. Tento problém sa týka najmä nozokomiálnych infekcií, ktoré v 50–60 % prípadov spôsobujú kmene baktérií vykazujúce multirezistenciu, napr. grampozitívny *Staphylococcus aureus*, špecificky MRSA a VRSA alebo gramnegatívne kmene baktérií produkujúce širokospektré betalaktamázy (ESBL), konkrétne *Pseudomonas aeruginosa* a *Klebsiella pneumoniae*. [22, 23] Riešením tohto problému je jednak objavovanie nových antimikróbných látok s odlišným mechanizmom účinku [24], ale aj zodpovedná preskripcia antibiotík a ich správne užívanie. [22]

Ako účinné proti mnohým bakteriálnym kmeňom sa ukázali látky, ktoré pripravili Karad a kol. [24], obsahujúce 1,2,4-oxadiazolový kruh a morfolín-chinolinovú časť (**Obr. 11**). Syntéza takýchto hybridných molekúl opäť vychádzala z vlastností samotných 1,2,4-oxadiazolov a chinolinových derivátov, autori predpokladali ich synergické antimikróbne pôsobenie. Všetky pripravené látky vykazovali buď dobrú alebo vynikajúcu inhibíciu u testovaných grampozitívnych (*Bacillus subtilis*, *Clostridium tetani*, *Streptococcus pneumoniae*) aj gramnegatívnych baktérií (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*). Okrem toho bola zisťovaná aj ich antifungálna aktivita voči *Aspergillus fumigatus* a *Candida albicans*, s podobne priaznivým výsledkom. Najväčším problémom tejto série látok je ich pomerne vysoká toxicita, ktorá je spôsobená ich schopnosťou poškodzovať DNA a tiež nízka absorpcia zapríčinená príliš vysokou lipofilitou.

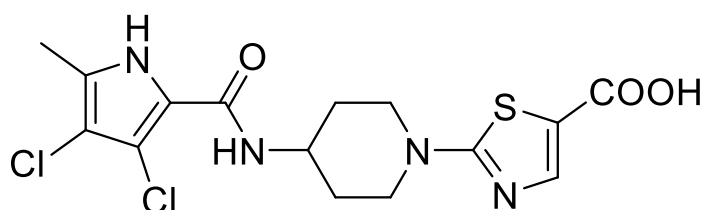


**Obr. 11** Základná štruktúra a najaktívnejšie molekuly zo série morfolín-chinolin-oxadiazolových hybridných molekúl (6d, 6h najlepšia inhibícia grampozitívnych baktérií, 6e najlepšia inhibícia gramnegatívnych baktérií)

Iným spôsobom hľadania nových molekúl je molekulový docking, pri ktorom sa pomocou počítačových programov prehľadávajú databázy s obrovským množstvom molekúl. Cieľom tohto systematického postupu je nájdenie malej skupiny molekúl, ktoré interagujú s cieľovým enzýmom, resp. s iným proteínom.

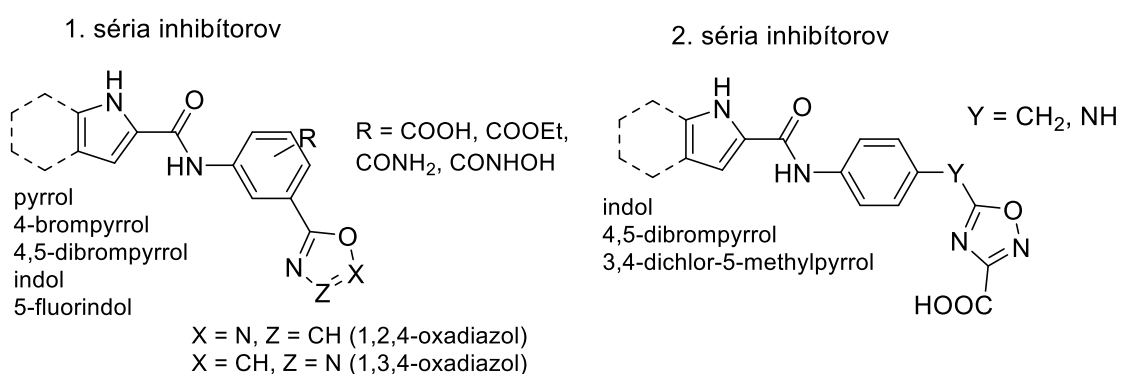
Týmto postupom vytvorili Sherer a kolektív [25] pyrrolkarboxamidové inhibítory DNA gyrázy. DNA gyráza a topoizomeráza IV sú bakteriálne enzýmy, ktoré patria do

skupiny topoizomeráz typu IIa. Udržiavajú terciárnu štruktúru DNA a zabezpečujú správne rozvinutie a zvinutie vlákna DNA pri replikácii bakteriálnych buniek. Ich inhibícia spôsobí narušenie syntézy novej DNA, čím vedie k bunkovej smrti. [25, 26] Jedná sa o atraktívny cieľový enzým, ktorý zaujal aj ďalších vedcov. Jakopin a spol. [26] naviazali na prácu Sherera a kol., od ktorých prevzali pyrrolkarboxamidový inhibítor (**Obr. 12**). Túto molekulu použili ako vodcovskú štruktúru, v ktorej zamenili 2-(piperidin-1-yl)thiazolové jadro za rôzne substituovaný 5-fenyl-1,2,4-oxadiazol (**Obr. 13**) s cieľom zlepšiť jej nevýhodný farmakokinetický profil.



**Obr. 12** Pyrrolkarboxamidový inhibítor DNA gyrázy, ktorý bol zvolený za vodcovskú štruktúru

Na základe molekulového dockingu predpokladali, že medzi 1,2,4-oxadiazolovým kruhom a DNA gyrázou dochádza k hydrofóbnym interakciám. Zámenou 1,2,4-oxadiazolu za izoméry 1,3,4-oxadiazol došlo k nestabilite koncovej karboxylovej skupiny a následnej dekarboxylácii. Tieto deriváty nemali inhibičnú aktivitu. 1,2,4-oxadiazolový kruh je z hľadiska interakcie s DNA gyrázou nevyhnutný a nie je možné ho zameniť, pretože stabilizuje koncovú karboxylovú skupinu, ktorá tvorí vodíkovú väzbu s enzýmom.

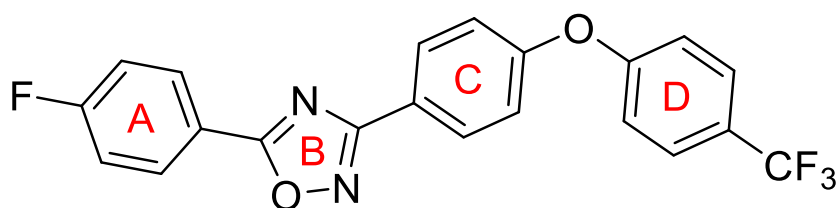


**Obr. 13** Dve série modifikácií vodcovskej štruktúry

Antibakteriálna aktivita bola stanovená voči grampozitívnym (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) a gramnegatívnym (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) baktériám. Žiadne z testovaných látok neboli aktívne voči gramnegatívnym baktériám a len slabo aktívne voči *S. aureus*. Jediná látka vykazovala dobrý inhibičný efekt na *E. faecalis*. [26]

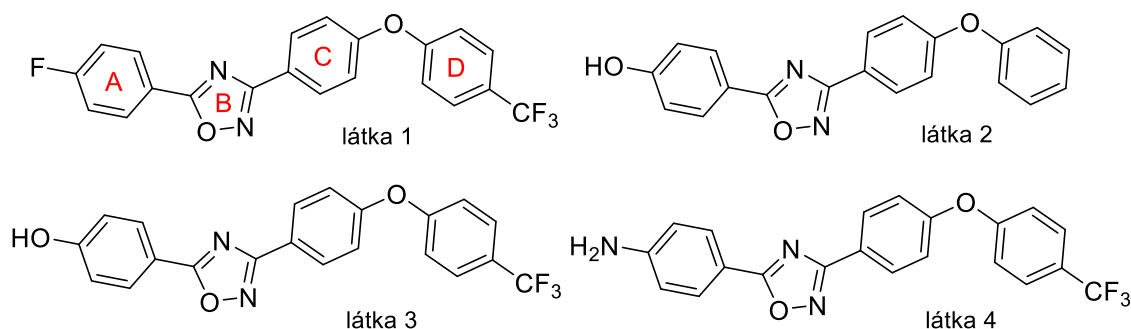
Ďalším významným cieľovým proteínom je tzv. penicillin-binding protein (PBP), ktorý inhibujú bežne využívané  $\beta$ -laktamové antibiotiká. PBP sú enzýmy nevyhnutné pre tvorbu peptidoglykánov bakteriálnej bunkovej steny, ich inhibícia teda vedie k zániku bunky [27, 28].  $\beta$ -laktamové antibiotiká boli využívané na liečbu infekcií spôsobených baktériou *Staphylococcus aureus* až do šesťdesiatych rokov minulého storočia, kedy sa objavili prvé prípady rezistencie. Tieto stafylokoky sa označujú ako tzv. MRSA. Dôvodom rezistencie u MRSA je prítomnosť génu kódujúceho penicillin-binding protein 2a (PBP2a), ktorý je odolný voči inhibícii  $\beta$ -laktamovými antibiotikami. V súčasnosti jedinými účinnými antibiotikami na liečbu infekcií spôsobených MRSA sú vankomycín a daptomycín, ktoré je nutné podávať parenterálne a linezolid, ktorý je možné podať aj perorálne. [27] Je dôležité zaoberať sa hľadaním nových, účinných molekúl, pretože MRSA sú pôvodcom nozokomiálnych infekcií [22], najmä závažnej bakterémie a endokarditídy [29].

O'Daniel a kol. [27] objavili novú skupinu non- $\beta$ -laktamových antibiotík so štruktúrou 1,2,4-oxadiazolu, ktoré inhibujú nielen mnohé PBP, ale aj PBP2a u MRSA. V ZINC databáze prehľadali 1,2 miliónov zlúčenín, z ktorých vybrali 50 látok s najvýznamnejším inhibičným potenciálom pre ďalšiu analýzu. Z týchto látok syntetizovali alebo zakúpili 29 zlúčenín s rôznou chemickou štruktúrou, u ktorých bola otestovaná antibakteriálna aktivita voči *Escherichia coli* a ESKAPE súboru baktérií (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a čeľaď *Enterobacteriaceae*). Z nich bola vybraná vodcovská štruktúra s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom (**Obr. 14**).



**Obr. 14** Vodcovská štruktúra novoobjavenej skupiny non- $\beta$ -laktamových antibiotík

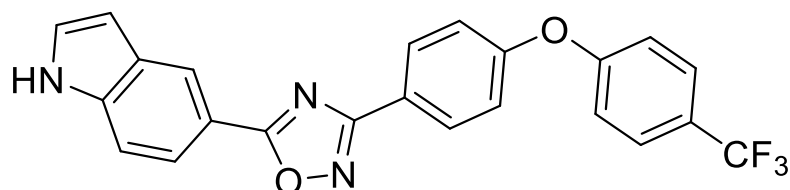
Samotná vodcovská štruktúra (**Obr. 14**) nevykazovala výraznú inhibíciu rastu testovaných kmeňov baktérií, no zistené hodnoty MIC boli reprodukovateľné. Jej modifikáciami syntetizovali 370 látok, u ktorých otestovali *in vitro* inhibičnú aktivitu voči rovnakým bakteriálnym kmeňom. Tri látky (**Obr. 15**, látky 2,3 a 4) vykazovali výbornú antibakteriálnu aktivitu proti *S. aureus*, vrátane MRSA a proti VRE a širokému spektru ďalších grampozitívnych baktérií. Látky 3 a 4 mali 100% biologickú dostupnosť po perorálnom podaní. Farmakologický účinok látok 2,3 a 4 bol preukázaný *in vivo* na myšiacích modeloch s peritonitídou spôsobenou MRSA [27].



**Obr. 15** Oxadiazolové deriváty odvodené od vodcovskej štruktúry (látko 1)

Autori naviazali na tento objav a realizovali štúdie medzi štruktúrou a aktivitou daných molekúl s cieľom optimalizovať ich farmakokinetické vlastnosti a antibakteriálnu aktivitu. Pripravili deriváty modifikáciou látky 3 (**Obr. 15**) v polohe 3 (kruhy C a D) [29] a v polohe 5 (kruh A) [30] na 1,2,4-oxadiazolovom cykle.

Z modifikácií kruhu A bola zvolená ako najvýhodnejšia zámena fenolickej skupiny za indolový cyklus. Táto látka (**Obr. 16**) mala najvyššiu aktivitu *in vivo* na myšacom modeli s peritonitídou vyvolanou *S. aureus* a zároveň najnižšiu cytotoxicitu. [30] Látka bola následne otestovaná *in vivo* na myšacom modeli s infekciou mäkkých tkanív stehna spôsobenou MRSA, kde bola účinná aj na linezolid-rezistentné MRSA [28]. *In vitro* boli najúčinnnejšie deriváty s pyrazolovým substituentom, no zároveň boli výrazne cytotoxické [30].



**Obr. 16** Derivát s najvyššou *in vivo* antibakteriálnou aktivitou a najnižšou toxicitou

Zámena kyslíkového mostíka medzi kruhmi C a D za síru alebo dusík nevedla k strate antibakteriálnej aktivity. Rôzne štruktúrne modifikácie na kruhu C taktiež nevedli k strate antibakteriálnej aktivity, s výnimkou derivátov, ktoré mali ako kruh A naviazaný indolový alebo pyrazolový substituent. Z pripravených derivátov boli neaktívne látky s kondenzovanými kruhmi C a D. [29]

Na základe týchto rozsiahlych SAR analýz bol vytvorený model trojdimenzionálnej kvantitatívnej analýzy medzi štruktúrou a aktivitou molekúl (3D-QSAR), ktorého cieľom bolo vytvoriť pravidlá pre tvorbu nových oxadiazolových antibiotík s lepšou antibakteriálnou aktivitou. Na základe tohto modelu je možné predpokladať biologickú aktivitu nosyntetizovaných látok. Objemné substituenty v *para* polohe kruhu A vedú k strate antibakteriálnej aktivity. Elektropozitívne skupiny

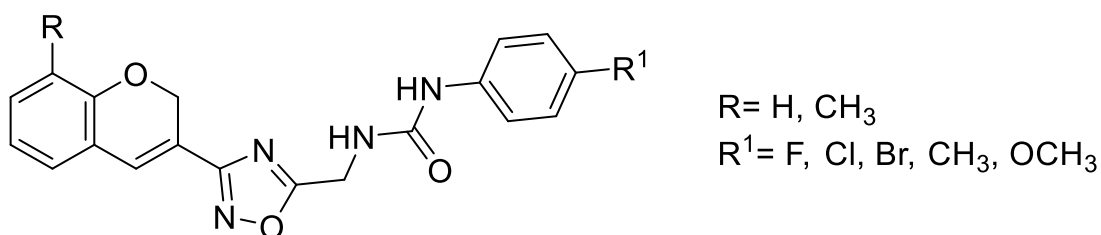
v tejto polohe (napr. aminoskupiny) vedú naopak k látkam s dobrou antibakteriálnou aktivitou. Prítomnosť objemného substituentu (napr. cyklopentyl, trifluormethyl) na kruhu D priaznivo ovplyvňuje antibakteriálnu aktivitu. [31]

Týmito novými antimikrobiálnymi činiteľmi, ktoré popísali O'Daniel a kol., sa zaoberali ďalej Carter a kolektív [32]. Ich cieľom bolo zistiť aktivitu týchto látok proti *Enterococcus faecium*, pretože O'Daniel a kol. sa zameriavali vo svojej práci primárne na aktivitu proti *Staphylococcus aureus*.

*Enterococcus faecium* patrí medzi pôvodcov obtiažne liečiteľných nozokomiálnych infekcií. Jedná sa o baktériu, ktorá ľahko podlieha mutáciám svojej genetickej výbavy, čo vedie k vzniku multirezistentných kmeňov. Medzi lieky prvej voľby pre liečbu infekcií spôsobených *E. faecium* patrí vankomycín, no súčasným problémom je nárast výskytu tzv. VRE. To obmedzuje terapiu na alternatívne antibiotiká ako daptomycín a linezolid. [32]

Aktivitu 1,2,4-oxadiazolového antibiotika (látka 2, **Obr. 15**) otestovali na 53 kmeňoch *E. faecium*, medzi ktoré boli zaradené kmene citlivé aj rezistentné na vankomycín a daptomycín. Účinok na všetky kmene, vrátane rezistentných, bol veľmi dobrý. Zároveň stanovili aj kinetiku baktericídneho účinku tejto látky, ktorá dovedy nebola stanovovaná. Jej baktericídny účinok je závislý na koncentrácii, nižšie koncentrácie nevykazujú túto aktivitu. Pri sledovaní toxicity došli k inému záveru ako O'Daniel – toxicita je dávkovo závislá, prejavila sa až pri vyšších dávkach. Na dosiahnutie inhibície rastu *E. faecium* ale postačujú nižšie dávky. Pri liečbe týchto infekcií sa často využíva kombinácia daptomycínu s  $\beta$ -laktamovými antibiotikami. Keďže 1,2,4-oxadiazoly pôsobia na rovnaký enzým (PBP) ako latkamy, testovali autori aj synergizmus účinku 1,2,4-oxadiazolov s daptomycínom, ktorý sa potvrdil. Táto kombinácia umožnila zníženie dávky daptomycínu a bola účinná na VRE a zvyšovala citlivosť kmeňov nereagujúcich na samotný daptomycín. [32]

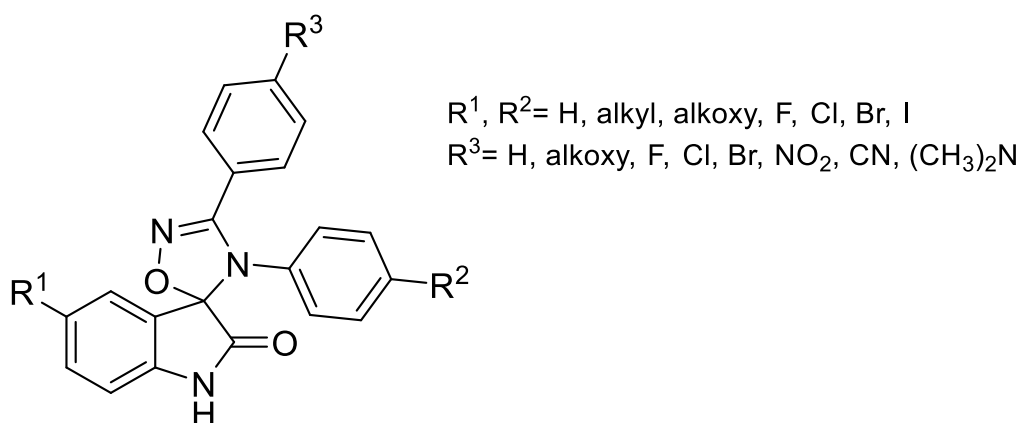
Kumar a kolektív [33] pripravili deriváty ury s 1,2,4-oxadiazolovým a chromenovým cyklom (**Obr. 17**). Predpokladom pre ich syntézu bola antibakteriálna, antifungálna a antivírusová aktivita u mnohých derivátov ury.



**Obr. 17** Deriváty ury s 1,2,4-oxadiazolovým kruhom

U pripravených látok bola otestovaná aktivita proti dvom gramnegatívnym baktériám (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Všetky látky vykazovali veľmi dobrú aktivitu voči obojm bakteriálnym kmeňom, buď porovnateľnú s ciprofloxacínom alebo dokonca vyššiu. SAR analýzou bolo zistené, že molekuly s methoxyskupinou na chroménovom jadre sú aktívnejšie ako molekuly bez tohto substituentu. [33]

S dôrazom na jednoduché a ekologické syntézy pripravili Shi a kolektív [34] sériu derivátov 1,2,4-oxadiazolu s indolovým cyklom (**Obr. 18**). Reakcie prebiehali v prostredí ethanolu s využitím 4-dimethylaminopyridínu ako katalyzátora. V porovnaní s reakciami katalyzovanými kovovými prvkami sú tieto syntézy priateľskejšie k životnému prostrediu.

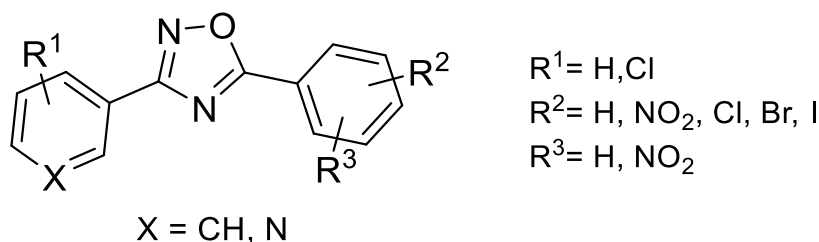


**Obr. 18** Deriváty 3',4'-diaryl-4'H-spiro[indolin-3,5'-(1',2',4')oxadiazol]-2-ony

Antibakteriálna aktivita bola otestovaná voči dvom gramnegatívnym (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) a dvom grampozitívnym (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) baktériám. Štyri látky s naviazaným halogénom na indolovom kruhu mali významnú antibakteriálnu aktivitu proti MRSA. Jedna látka s nitroskupinou naviazanou na fenyle (substituent  $R^3$ ) vykazovala najvyššiu aktivitu proti *S. epidermidis*. [34]

K obdobnému záveru prišli aj Cunha a kol. [35], ktorí pripravili deriváty 3,5-difenyl-1,2,4-oxadiazolu a 3-pyridyl-5-fenyl-1,2,4-oxadiazolu (**Obr. 19**). Antibakteriálna aktivita derivátov bola otestovaná proti grampozitívnym (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) aj gramnegatívnym (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) baktériám. Niektoré deriváty boli aktívne proti *E. coli*, *E. faecalis* a *P. mirabilis*, ale ani jedna zlúčenina nebola aktívna proti *S. aureus* a *P. aeruginosa*. Z aktívnych látok len jediná bola bez nitroskupiny. Aktívne nitrované deriváty boli substituované jednou alebo dvoma nitroskupinami v rôznych polohách na fenyle v polohe 5 na 1,2,4-oxadiazolovom kruhu (subst.  $R^2, R^3$ ). Niektoré deriváty boli

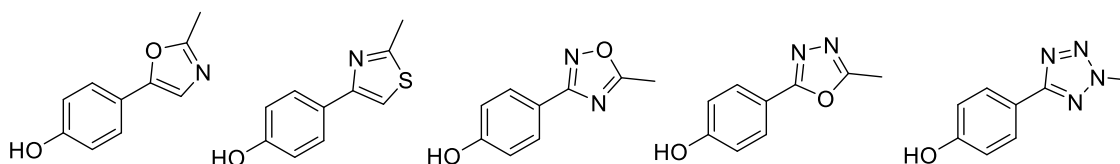
neaktívne pravdepodobne v dôsledku ich vysokých hodnôt PSA (polárny povrch molekuly), čo zabraňuje ich prechodu cez bakteriálnu membránu pasívnou difúziou.



**Obr. 19** Základná štruktúra 3,5-diaryl-1,2,4-oxadiazolových derivátov

Vysoká aktivita nitrovaných zlúčenín súvisí pravdepodobne s mechanizmom ich účinku. Nitroskupina je v bakteriálnych bunkách redukovaná, pričom vznikajú voľné kyslíkaté radikály, ktoré spôsobujú oxidačný stres. Výsledkom pôsobenia kyslíkatých radikálov je narušenie integrity membrány bakteriálnej bunky, peroxidácia proteínov a enzýmov a poškodenie DNA. Ľudské bunky sú pred oxidačným stresom chránené absenciou enzýmu, ktorý redukuje nitroskupiny. [35]

Sadek a kol. [36] syntetizovali päť látok s rovnakým substituentom na heterocykle, 4-hydroxyfenylom (**Obr. 20**). Okrem 1,2,4-oxadiazolu pripravili aj 1,3,4-oxadiazol; 1,3-oxazol; 1,3-thiazol a 1,2,3,4-tetrazol. U všetkých látok bola testovaná antibakteriálna aktivita proti MRSA a *E. coli* a antifungálna aktivita proti *Aspergillus niger*. Významnú antibakteriálnu aj antifungálnu aktivitu mali len 1,2,4 a 1,3,4-oxadiazolové deriváty.

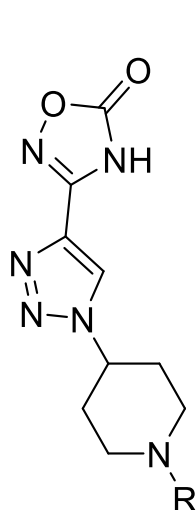


**Obr. 20** Deriváty s rôznymi heterocyklickými jadrami, ktoré pripravili Sadek a kol.

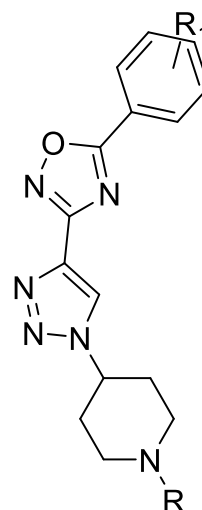
### 2.1.3 Antifungálna aktivita

Mykotické infekcie sú spôsobované mikroskopickými hubami, ktoré vo väčšine prípadov vyvolávajú nezávažné povrchové mykózy. Závažnejší klinický priebeh majú systémové mykózy postihujúce vnútorné orgány, na ktoré sú náchylní hlavne pacienti s oslabeným imunitným systémom. Výskum v oblasti nových antifungálnych látok sa zameriava primárne na hľadanie látok účinných proti pôvodcom systémových mykóz, napr. *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, atď.

Dobrú antifungálnu aktivitu vykazujú látky s 1,2,3-triazolovým a 1,2,4-oxadiazolovým kruhom. Ako prví tieto zlúčeniny popísali Sangshetti a kol. [37], ktorí pripravili sériu derivátov (**Obr. 21**). Tento objav zmienila vo svojej diplomovej práci Dzámová. [7]



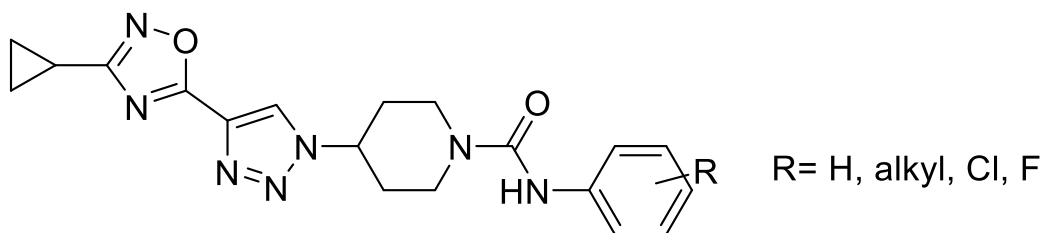
**Obr. 21** Štruktúra derivátov 3-[1-(1-subst. 4-piperidyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-onu



**Obr. 22** Štruktúra 3-[1-(1-subst. 4-piperidyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]-5-subst. fenyl-1,2,4-oxadiazolov

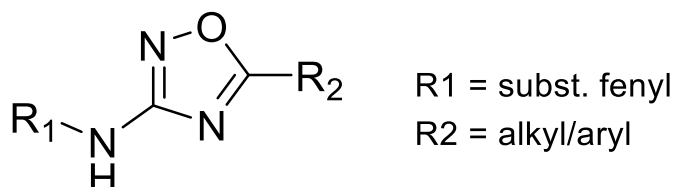
Vďaka priaznivým výsledkom pokračovali autori v tejto práci a pripravili ďalšiu sériu derivátov zámennou ketonickej skupiny na 1,2,4-oxadiazole za rôzne substituovaný fenyl (**Obr. 22**). Ich antifungálna aktivita bola otestovaná proti *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans* a *Fusarium oxysporum*. Väčšina zlúčenín vykazovala dobrú antifungálnu aktivitu, tri látky z celej série mali účinok ekvipotentný s mikonazolom. [38]

Sériu derivátov s podobnou štruktúrou pripravili Krolenko a kolektív [39]. Ich aktivitu otestovali jednak proti kvasinke *Candida albicans*, ale aj proti grampozitívnym (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) a gramnegatívnym (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*) baktériám. Významnú antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu mali len látky s fenylmočovínovou časťou (**Obr. 23**).



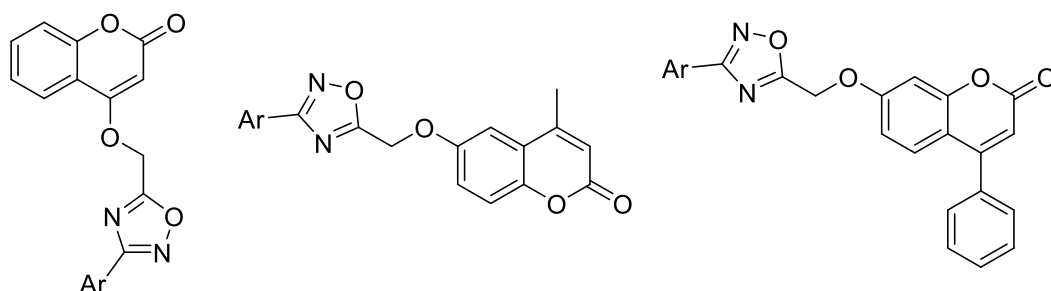
**Obr. 23** Deriváty 4-[4-(3-alkyl(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]piperidínu s fenylmočovínovou skupinou

Yerande a kol. [40] syntetizovali rôzne substituované 3-fenylamino-5-aryl/alkyl-1,2,4-oxadiazoly (**Obr. 24**), u ktorých otestovali antifungálnu a antibakteriálnu aktivitu. Väčšina látok vykazovala dobrú inhibičnú aktivitu na *Candida albicans* a niektoré látky boli antibakteriálne účinné na *Staphylococcus aureus*. Jedna látka bola účinnejšia ako referenčný azithromycín. Na gramnegatívne baktérie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) neboli tieto deriváty účinné.



**Obr. 24** Základná štruktúra derivátov 3-fenylamino-5-aryl/alkyl-1,2,4-oxadiazolu

Krishna a kol. [41] sa rozhodli skombinovať 1,2,4-oxadiazoly s kumarínovou štruktúrou na základe dobrej protimikróbnej aktivity týchto látok. Pripravili tri série derivátov (**Obr. 25**), u ktorých otestovali antibakteriálnu aktivitu proti grampozitívnemu *Staphylococcus aureus* a gramnegatívnej *Escherichia coli* a antifungálnu aktivitu proti *Aspergillus terreus* a *Rhizoctonia solani*. V porovnaní so štandardnými antibiotikami a antimykotikami bola ich aktivita len stredne dobrá alebo slabá.



**Obr. 25** Tri série kumarínových derivátov oxadiazolov  
Vľavo 4-[(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy]-kumariny.  
V strede 6-[(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy]-4-methylkumariny.  
Vpravo 7-[(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)methoxy]-4-fenylkumariny

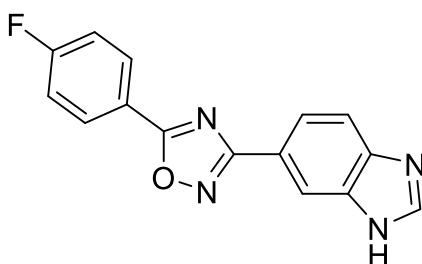
## 2.2 Iné účinky 1,2,4-oxadiazolov

### 2.2.1 Antioxidačné účinky

Antioxidačne pôsobiace látky dokážu ochrániť bunky pred oxidačným stresom. Vďaka tomu je možné ich uplatnenie v prevencii nádorových ochorení a v liečbe chronických zápalových ochorení (napr. ulcerózna kolitída), neurodegeneratívnych a kardiovaskulárnych ochorení a diabetu. Jednou z vhodných stratégií je využitie induktorov tzv. Nrf2, ktorý reguluje transkripciu génov kódujúcich mnohé antioxidačné enzýmy. V prípade oxidačného stresu, ktorý môže byť vyvolaný napr. reaktívnymi

kyslíkatými radikálmi, sa Nrf2 viaže na ARE príslušných génov a spúšťa sa transkripcia a translácia antioxidantných enzýmov, ktoré chránia bunku. Cieľená indukcia Nrf2 teda spúšťa chemoprotektívne deje v bunkách. [42, 43, 44]

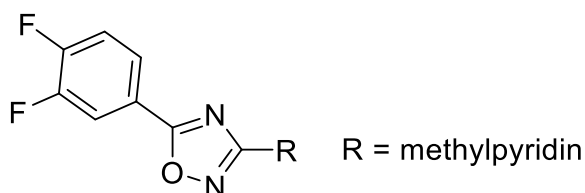
Xu a kol. [42] pripravili sériu účinných aktivátorov Nrf2 s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom. Najaktívnejší derivát (**Obr. 26**) bol otestovaný *in vivo* na myšiach. *In vivo* štúdia potvrdila zníženie prozápalových cytokínov (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-17) v sére myší, pričom účinok testovaného derivátu prevyšoval efekt dexametazonu. Aktivátory Nrf2 majú teda potenciálne využitie aj ako protizápalové liečivá.



**Obr. 26** Derivát s najvyšším indukčným potenciálom Nrf2, najlepšou rozpustnosťou vo vode a prestupom cez biologické membrány

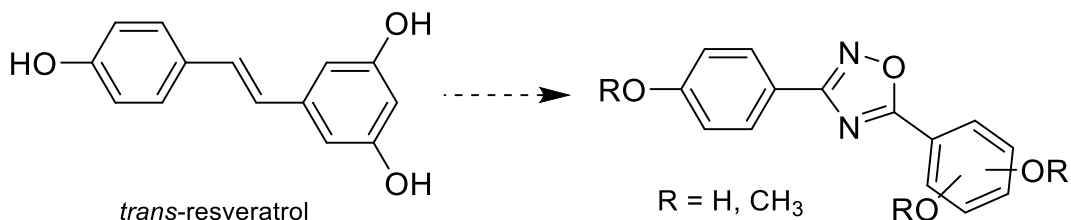
Potenciál tohto derivátu (**Obr. 26**) sledovali autori aj v ďalších štúdiách. Jedno z možných využití je v liečbe ulceróznej kolitídy. *In vivo* testy na myšiach preukázali zníženie sérových hladín prozápalových cytokínov (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Testovaná látka mala väčší protizápalový účinok ako štandardný olsalazín. [44]

Ďalšou z možností využitia je liečba poškodenia pečene pri predávkovaní paracetamolom. 5–10 % z podaného množstva paracetamolu sa metabolizuje na toxický metabolit NAPQI (*N*-acetyl-*para*-benzochinon-imin), ktorý vedie k závažnému poškodeniu pečene. Ako obranný mechanizmus organizmu sa spúšťa aktivácia Nrf2-ARE kaskády, preto indukcia Nrf2 s využitím oxadiazolov môže zmierniť hepatotoxicitu paracetamolu. Štruktúrnymi modifikáciami pripravili sériu derivátov odvodených od tejto látky. Zlúčenina s najvyššou aktivitou (**Obr. 27**) bola otestovaná *in vivo* na myšiach, pričom sa potvrdil jej antioxidantný efekt – došlo k zníženiu ALT a AST v sére myší, ktoré slúžia ako markery hepatálneho poškodenia, zvýšilo sa množstvo antioxidantných enzýmov a znížilo sa množstvo nekrotických buniek pečene. [43]



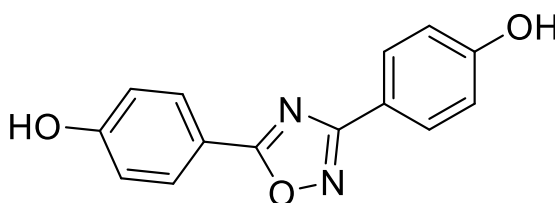
**Obr. 27** Najaktívnejší derivát z novej série aktivátorov Nrf2 s 60-násobne vyšším účinkom oproti pôvodnej látke

Resveratrol je polyfenolická látka bežne prítomná v rastlinných zdrojoch s antioxidantným, protizápalovým a antiagregačným účinkom. Jeho antioxidantná aktivita spočíva v schopnosti vychytávať voľné kyslíkaté radikály. Gobec a kolektív [45] pripravili sériu štruktúrnych analógov resveratrolu s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom (**Obr. 28**).



**Obr. 28** Analógy *trans*-resveratrolu s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom

Najaktívnejšia látka (**Obr. 29**) mala minimálnu toxicitu na ľudské bunky, najvýraznejšiu antioxidantnú a protizápalovú aktivitu, ktorá prevyšovala resveratrol a výrazne znižovala tvorbu prozápalových cytokínov IL-8, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ .

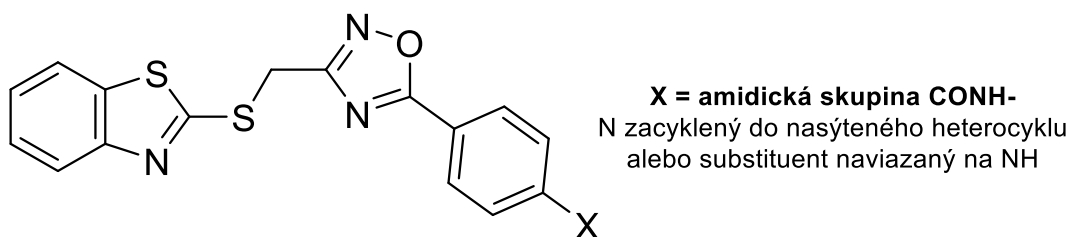


**Obr. 29** Najaktívnejší analóg resveratrolu. Štruktúrne podobný *trans*-resveratrolu vďaka voľným hydroxylovým skupinám v para-polohe fenylových zvyškov.

## 2.2.2 Protizápalové účinky

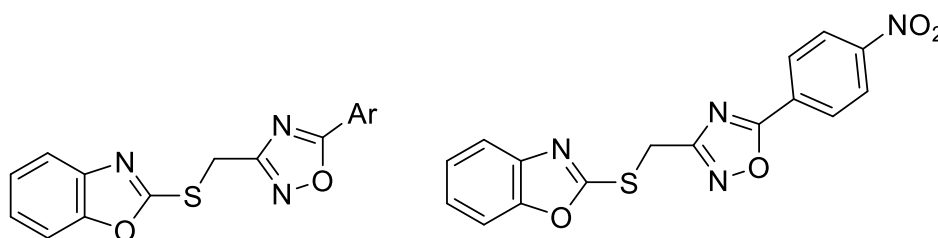
V súčasnosti medzi najčastejšie používané protizápalové a analgeticky pôsobiace liečivá patrí skupina nesteroidných antireumatík (NSAID). Pôsobia buď neselektívne inhibíciou cyklooxygenázy (COX) 1 a 2 alebo preferenčne, resp. selektívne inhibujú COX-2. Obe izoformy premieňajú arachidonovú kyselinu na prostaglandíny zohrávajúce úlohu v patogenéze zápalu, no COX-2 je exprimovaná primárne v mieste zápalu. Okrem toho môže byť arachidonová kyselina metabolizovaná 5-lipoxygenázou (5-LOX) na leukotriény, ktoré taktiež pôsobia ako mediátory zápalu. [46, 47]

Yatam a kol. [46] syntetizovali sériu 1,2,4-oxadiazolov spojených s 2-sulfanylbenzothiazolovým jadrom (**Obr. 30**). Väčšina látok vykazovala dobrú inhibíciu COX-1 a COX-2 *in vitro*, látky pôsobili preferenčne na COX-2. Niektoré látky inhibovali zároveň COX-2 a 5-LOX, čím majú väčší protizápalový potenciál oproti bežne využívaným NSAID. Dve látky mali zároveň veľmi dobrú antioxidantnú aktivitu. *In vivo* testovaním bola zistená vyššia protizápalová aktivita oproti štandardnému ibuprofenu u dvoch látok.



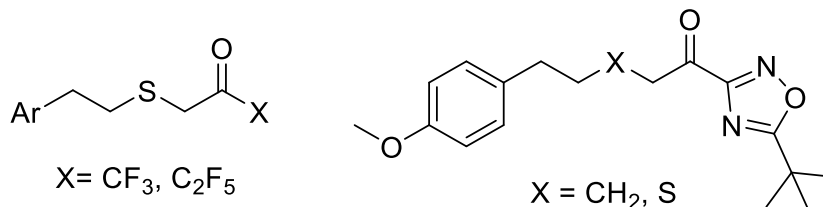
**Obr. 30** Deriváty 1,2,4-oxadiazolu spojeného s 2-sulfanylbenzothiazolovým jadrom pôsobiace ako COX-2/5-LOX inhibítory

Autori syntetizovali aj ďalšie selektívne COX-2 inhibítory s 1,2,4-oxadiazolovým kruhom spojeným s benzoxazolom. (**Obr. 31**) Na základe molekulového dockingu predpokladali, že 1,2,4-oxadiazolový kruh je zodpovedný za selektivitu voči druhej izoforme cyklooxygenázy. Štyri látky vykazovali dobrú selektívnu inhibíciu COX-2 *in vitro* aj *in vivo*. Jedna z týchto látok mala zároveň výborný antioxidačný potenciál. [47]



**Obr. 31** Vľavo - štruktúra COX-2 inhibítorov s 1,2,4-oxadiazolovým kruhom a benzoxazolom. Vpravo- Jeden z najúčinnjších inhibítorov COX-2 a najlepšou antioxidačnou aktivitou.

Významným cieľovým enzýmom je aj fosfolipáza A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalyzujúca uvoľnenie vyšších mastných kyselín, vrátane kyseliny arachidonovej, ktorej metabolizáciou vznikajú prostaglandíny a leukotriény. Inhibícia PLA<sub>2</sub> zohráva dôležitú úlohu v liečbe niektorých zápalových ochorení, napr. reumatoidnej artritídy. Pomocou molekulového dockingu sledovali Mouchlis a kol. [48] interakciu fluorketónových inhibítorov PLA<sub>2</sub> s týmto enzýmom. Na základe sledovania tejto interakcie syntetizovali štruktúrne podobné keto-1,2,4-oxadiazolové inhibítory PLA<sub>2</sub> (**Obr. 32**).



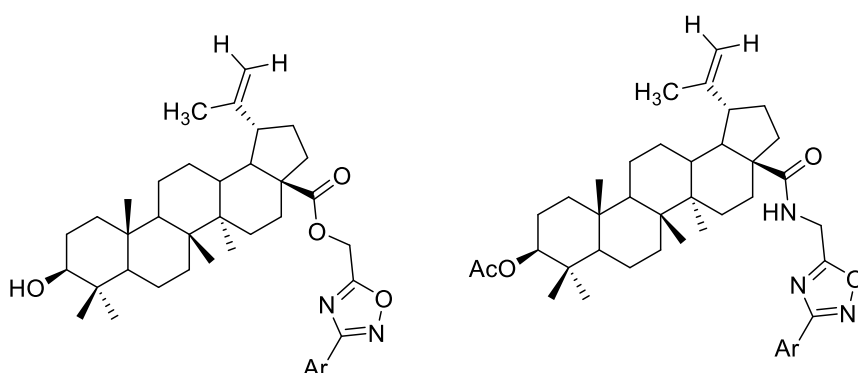
**Obr. 32** Fluorketónové (vľavo) a keto-1,2,4-oxadiazolové (vpravo) inhibítory PLA<sub>2</sub>

### 2.2.3 Cytostatické účinky

Kyselina betulinová je terpenická zlúčenina s mnohými biologickými účinkami – pôsobí antibakteriálne, protizápalovo a cytotoxicky. V nádorových bunkách indukuje apoptózu, no toxicita pre zdravé bunky, ktorá býva charakteristická pre väčšinu

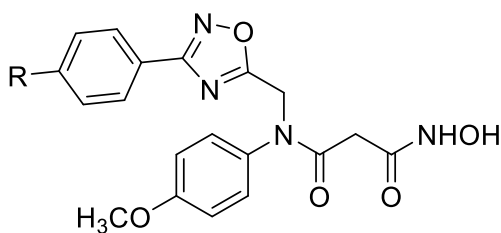
cytostatík, u nej chýba. To robí z kyseliny betulínovej atraktívnu štruktúru pre vývoj nových liečiv. [49, 50]

Challa a kol. [49] pripravili estery kyseliny betulínovej s 1,2,4-oxadiazolmi (**Obr. 33**). Cytotoxická aktivita derivátov bola stanovená *in vitro* na bunkových líniách kolorektálneho karcinomu (Colo-205), hepatocelulárneho karcinomu (HepG2) a cervikálneho karcinomu (HeLa). Všetky látky mali dobrú cytotoxickú aktivitu okrem dvoch derivátov, ktoré boli neúčinné na Colo-205 a HepG2 bunky. Autori odlišným postupom [50] pripravili amidy kyseliny betulínovej s rovnako substituovanými 1,2,4-oxadiazolmi. Cytotoxická aktivita amidov (**Obr. 33**) bola ekvipotentná s príslušnými esterami.



**Obr. 33** Vľavo estery betulínovej kyseliny. Vpravo amidy betulínovej kyseliny.  
4-Pyridín-1,2,4-oxadiazol ester/amid betulínovej kyseliny – najaktívnejší voči HeLa  
2-Methoxyfenyl-1,2,4-oxadiazol ester/amid betulínovej kyseliny – najaktívnejší voči Colo-205 a HepG2

Histon deacetyláza (HDAC) je ďalším potenciálnym cieľom vo vývoji cytostatík. HDAC ovplyvňuje génovú expresiu, je spájaný s down-reguláciou tumor-supresorových génov. Zvýšená expresia tohto enzýmu bola preukázaná u mnohých typov nádorových ochorení a jej inhibícia preukázateľne potláča proliferáciu buniek a angiogénu. Yang a kolektív [51] pripravili inhibítory HDAC s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom (**Obr. 34**). Väčšina pripravených derivátov vykazovala dobrú inhibíciu HDAC, pričom dve látky aktivovali indukciu apoptózy v HepG2 bunkách výraznejšie ako štandard SAHA. Majú potenciálne využitie v liečbe hepatálneho karcinomu.



**Obr. 34** Základná štruktúra inhibítorov HDAC s 1,2,4-oxadiazolovým jadrom

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Chemická časť

Pri príprave boli použité komerčne dostupné chemikálie:

- Anhydrid kyseliny propiónovej (97%, Aldrich USA)
- Anhydrid kyseliny butánovej (98%, Aldrich USA)
- Anhydrid kyseliny isobutánovej (97%, Aldrich USA)
- Anhydrid kyseliny benzoovej ( $\geq 95\%$ , Aldrich USA)
- Anhydrid kyseliny 2-chlóroctovej (95%, Aldrich USA)
- Anhydrid kyseliny pivalovej (99%, Aldrich USA)
- Kyselina isonikotinová (k dispozícii na katedre)
- Kyselina fenylacetová (čistá, Lachema Brno)
- Kyselina 4-methoxyfenylacetová (99%, Aldrich USA)
- Kyselina 4-brómfenylacetová (98%, Aldrich USA)
- Pyrazin-2-karbonitril (Aldrich USA)
- Pyridin-4-karbonitril (pre syntézu, Merck Germany)
- Morfolín (k dispozícii na katedre)
- 1-(2-Hydroxyethyl)piperazín (Aldrich, USA)
- Benzaldehyd (k dispozícii na katedre)

Ostatné použité látky boli buď k dispozícii v laboratóriu ako medziprodukty pripravené od predchádzajúcich študentov alebo boli pripravené známymi postupmi uvedenými v diplomových prácach iných študentov. *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid bol pripravený podľa Katirtzi [4] a *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchlorid bol pripravený podľa Harikovej [5].

Tenkvrstevná chromatografia (TLC) bola realizovaná na TLC hliníkových doskách Silikagel 60 F254 (Merck Germany). Ako mobilná fáza bola používaná zmes hexanu a etyl-acetátu v pomere 4:6 (v/v) alebo 6:4 (v/v). Vhodný pomer bol vybraný na základe retenčných faktorov jednotlivých látok tak, aby boli na chromatografickej doske dobre rozlišiteľné.

Pre mikrovlnné reakcie bol použitý reaktor CEM Discover s fokusovaným poľom s pripojeným autosamplerom Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, UA) využívajúci CEMs Synergy™ software pre nastavenie a sledovanie podmienok reakcií.

Väčšina produktov bola vyčistená na flash chromatografe CombiFlash® Rf (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA). Separácia prebiehala gradientovou elúciou za použitia hexánu (LachNer, Neratovice, Česká republika) a ethyl-acetátu (Penta, Praha, Česká republika) ako mobilnej fázy. Ako stacionárna fáza bol použitý silikagél (0,040–0,063 mm, Merck, Darmstadt, Nemecko). Menšia časť produktov bola vyčistená na flash chromatografe PuriFlash® 420 ((Interchim®, Montluçon, France) gradientovou elúciou za použitia hexánu (LachNer, Neratovice, Česká republika) a ethyl-acetátu (Penta, Praha, Česká republika) ako mobilnej fázy. Na separáciu boli použité komerčne dostupné kolony naplnené silikagélom o váhe 40 g, s veľkosťou častíc 50 µm a pod maximálnym tlakom 20 bar (PF-50SIHC-F0040). Prístroj PuriFlash využíva software Interchim software 5.1 (Interchim®, Montluçon, France).

Pred analýzou boli všetky látky sušené minimálne 24 hodín v exsikátore nad oxidom fosforečným za zníženého tlaku 1,33 kPa. Teploty topenia boli stanovované na digitálnom bodotávku Stuart SPM 20 a neboli korigované.

Na overenie čistoty látky u tuhých vzoriek bola využitá elementárna analýza, ktorá bola prevedená na analyzátore Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Nemecko).

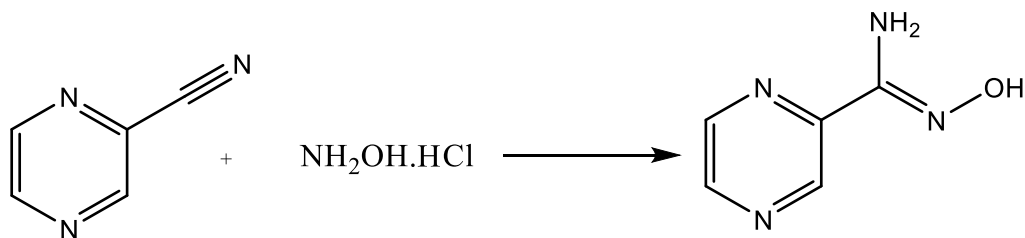
U kvapalných vzoriek bola využitá vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Ako stacionárna fáza bola použitá kolona Zorbax SB-Aq 150×4,6 mm (5µm). Separácia bola prevedená gradientovou elúciou za využitia vody a acetonitrilu ako mobilnej fázy, pomer rozpúšťadiel sa menil od 10 % acetonitrilu na začiatku separácie po 85 % na jej konci. Rýchlosť prietoku mobilnej fázy bola 1 ml/min. Teplota, pri ktorej prebiehala separácia bola 40°C. Absorbancia bola zaznamenávaná pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky, koncentrácia meraného roztoku bola 1,5 mg/ml.

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektrá boli merané pomocou VNMR S500 spektrometra pracujúcom na frekvencii 500 MHz pre vodíkové spektrum a 125 MHz pre uhlíkové spektrum. Chemické posuny sú uvádzané ako hodnoty δ v ppm a sú nepriamo vzťahnuté na tetramethylsilan (TMS) prostredníctvom signálu rozpúšťadla (2,49 ppm pre <sup>1</sup>H a 39,7 ppm pre <sup>13</sup>C v DMSO a 7,26 ppm pre <sup>1</sup>H a 77,0 ppm pre <sup>13</sup>C v CDCl<sub>3</sub>). Interakčné konštanty J sú uvádzané v hodnotách Hz.

IČ spektrá boli merané pre pevné aj kvapalné vzorky na spektrofotometri NICOLET 6700 metódou ATR-Ge. Vlnočty sú uvádzané v cm<sup>-1</sup>.

### 3.1.1 Syntéza medziproduktov

#### 3.1.1.1 Syntéza *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (AMOX-0)



0,06 mol (6,3 g) pyrazin-2-karbonitrilu bolo rozpustené v 9 ml ethanolu. 0,12 mol (8,34 g) hydroxylamin-hydrochloridu bolo rozpustené v 9 ml vody a pridané k ethanolickému roztoku pyrazin-2-karbonitrilu. 0,12 mol (12,72 g) uhličitanu sodného bolo rozpustené v 75 ml vody a postupne pridané k zmesi. Celá zmes bola zahrievaná pri teplote 70 °C pod spätným chladičom po dobu 5 hodín. Po schladnutí boli vzniknuté kryštály odsaté a premyté vodou. Zlúčenina bola rekryštalizovaná z bezvodého ethanolu.

Sumárny vzorec: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 138,13

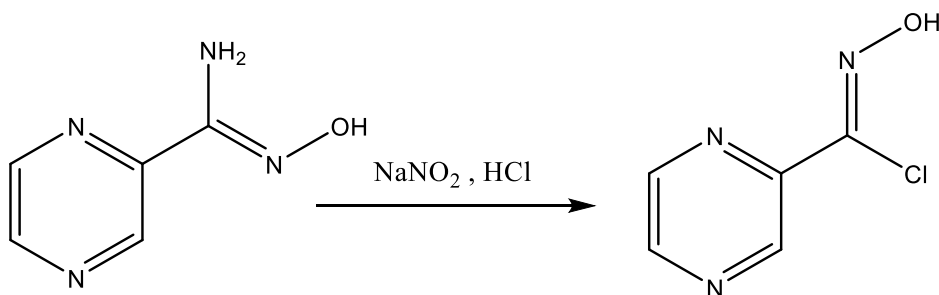
Vzhľad: biele ihlicovité kryštály

Výtťažok reakcie: 5,81 g (70 %)

Teplota topenia: 184–186 °C

Totožnosť látky bola potvrdená porovnaním retenčných faktorov syntetizovanej látky so štandardom a porovnaním teploty topenia (ref. [4] 185–187 °C).

#### 3.1.1.2 Syntéza *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchloridu (Cl-0)



*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (14,60 mmol; 2,00 g) bol rozpustený v 15 ml koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej a 40 ml vody pri teplote 0 °C. Dusitan sodný (18,1 mmol; 1,25 g) v 7 ml vody bol za miešania prikvapkaný k roztoku amidoximu. Zmes bola miešaná 1,5 hodiny pri teplote 0 °C a potom bol pomaly pridávaný hydrogenuhličitan sodný do dosiahnutia hodnoty pH 3. Vylúčená zrazenina bola sfiltrovaná, premytá ľadovou vodou a usušená v exsikátore. Látka bola rekryštalizovaná z 99 % acetonitrilu.

Sumárny vzorec: C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>ClN<sub>3</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 157,56

Vzhľad: biela kryštalická látka

Výťažok reakcie: 1,74 g (76 %)

Teplota topenia: 160 °C (ref. 130 °C za rozkladu [5])

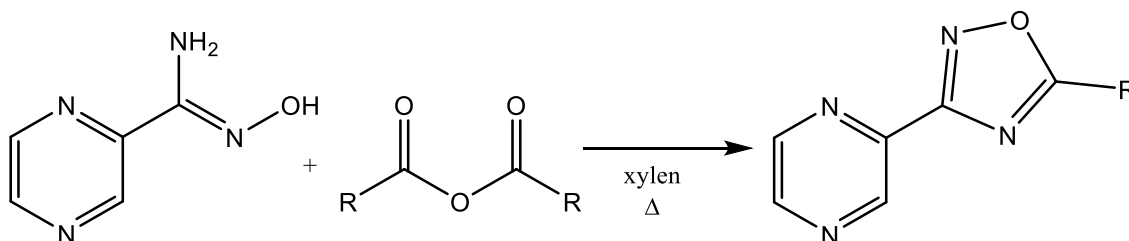
Elementárna analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	38,12	2,56	26,67
<b>Zistené</b>	37,31	2,50	26,34

Napriek tomu, že teploty topenia neboli zhodné, totožnosť látky bola potvrdená porovnaním retenčných faktorov syntetizovanej látky so štandardom a elementárnou analýzou.

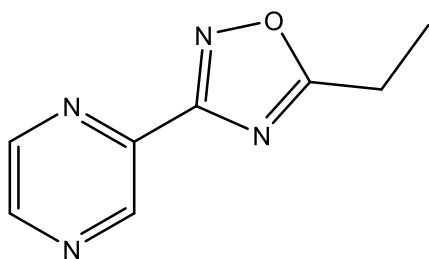
### 3.1.2 Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karboximidamidu a anhydridov karboxylových kyselín

Všeobecný postup:



Zmes *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,01 mol, 1,38 g) a príslušného anhydridu (0,01 mol) v 25 ml xylenu bola zahrievaná pod spätným chladičom po dobu 3 hodín pri teplote 150°C. Pred ukončením reakcie bola prevedená TLC analýza, na základe ktorej bola potvrdená neprítomnosť východzej látky. Reakčná zmes bola naadsorbovaná na silikagél a rozpúšťadlo bolo odparené za zníženého tlaku s využitím vákuovej odparky. Zmes bola podrobená deleniu na flash chromatografe a výsledný produkt bol rekrystalizovaný z bezvodého ethanolu.

### 3.1.2.1 Syntéza 5-ethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0c)



Na prípravu sa použilo 1,3 ml anhydridu kyseliny propiónovej (1,3 g;  $\rho = 1,015$  g/ml).

Sumárny vzorec:  $C_8H_8N_4O$

Relatívna molekulová hmotnosť: 176,07

Vzhľad: biela kryštalická látka

Výťažok reakcie: 1,63 g (93 %)

Teplota topenia: 42–45 °C (ref. 52–57 °C [52])

Elementárna analýza:

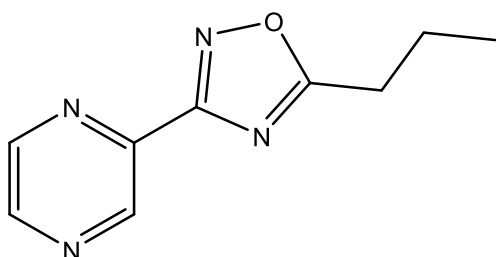
	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	54,54	4,58	31,80
<b>Zistené</b>	54,63	4,51	31,88

IČ spektrum: 2984, 2942 (alif.), 1587, 1573 (C=N), 1154 (C=N pyrazin, C-O), 1052 (C=C pyrazin), 912 (N-O)

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.23 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, H3), 8.86-8.83 (2H, m, H5, H6), 3.06 (2H, q,  $J=7,4$  Hz,  $CH_2$ ), 1.35 (3H, t,  $J=7,4$  Hz,  $CH_3$ )

$^{13}C$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  182.2, 166.1, 147.2, 145.4, 143.9, 141.9, 19.8, 10.5

### 3.1.2.2 Syntéza 5-propyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0d)



**Postup 1:** Všeobecný postup 3.1.2.

Na reakciu sa použilo 1,64 ml anhydridu kyseliny butánovej (1,58 g;  $\rho = 0,967$  g/ml).

Týmto spôsobom sa látku nepodarilo pripraviť.

**Postup 2:** *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,01 mol, 1,38 g) bol zahrievaný s anhydridom kyseliny butánovej (0,068 mol, 13,37 ml). Reakcia bola ukončená po 1 hodine varu na základe monitorovania priebehu reakcie pomocou TLC. Nadbytok anhydridu bol odstránený pridaním 25–29% vodného roztoku amoniaku do neutrálneho pH. Zmes bola naadsorbovaná na silikagél a podrobená deleniu na flash chromatografe. Produkt bol dvakrát rekryštalizovaný z bezvodého ethanolu. Po prvej rekryštalizácii elementárna analýza ukázala prítomnosť nečistôt.

Sumárny vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 190,21

Vzhľad: biela kryštalická látka

Výťažok reakcie: 0,90 g (47 %)

Teplota topenia: 48,0–49,2 °C

Elementárna analýza:

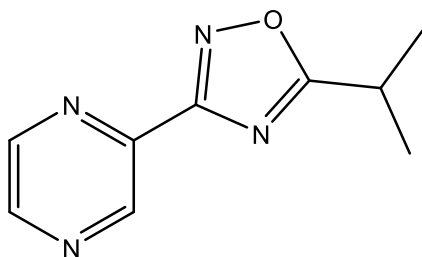
	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	56,83	5,30	29,46
<b>Zistené</b>	56,81	5,29	29,65

IČ spektrum: 2969, 2940, 2880 (alif.), 1572, 1558 (C=N), 1180 (C=N pyrazin), 1155 (C-O), 1047 (C=C pyrazin), 913 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.23 (1H, d, *J*=1,0 Hz, Ar), 8.86-8.84 (2H, m, Ar), 3.02 (2H, t, *J*=7,5 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.87-1.77 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.99 (3H, t, *J*=7,5 Hz, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C, NMR (125 MHz, DMSO) δ 181.2, 166.1, 147.2, 145.4, 143.9, 141.9, 27.8, 19.6, 13.5

### 3.1.2.3 Syntéza 5-isopropyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0e)



Na prípravu sa použilo 1,7 ml anhydridu kyseliny isobutánovej (1,58 g; ρ= 0,9535 g/ml).

Sumárny vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O

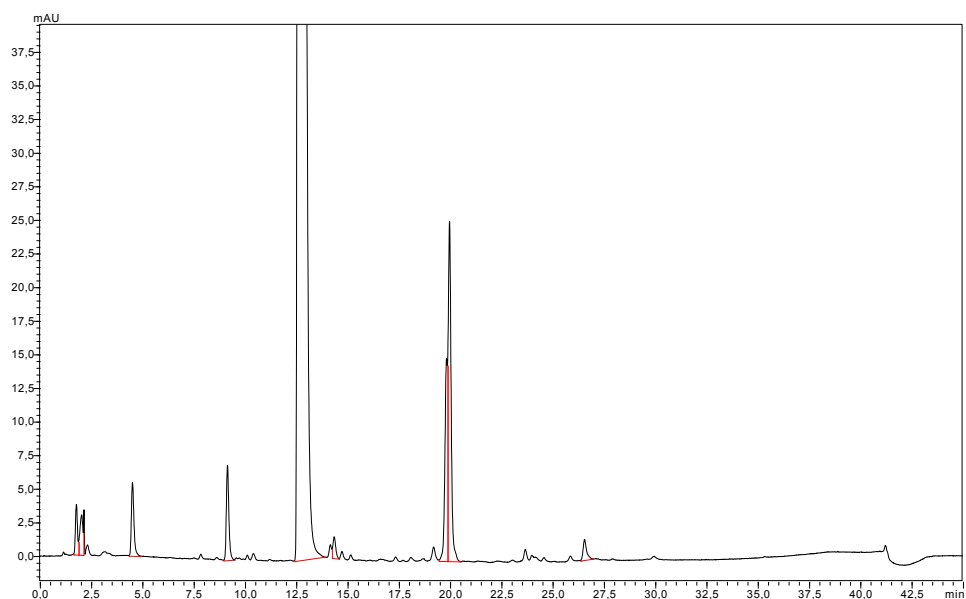
Relatívna molekulová hmotnosť: 190,21

Vzhľad: žltá olejovitá látka, pri nižšej teplote netuhne

Výtťažok reakcie: 1,73 g (90 %)

Elementárnou analýzou nie je možné overiť čistotu látky, nakoľko sa jedná o kvapalnú vzorku. Látka bola vyčistená na flash chromatografe. Na overenie čistoty bola využitá HPLC analýza, ktorá potvrdila 98% čistotu látky. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 273 nm, pričom sa jedná o absorpčné maximum hlavného píku.

Záznam získaný HPLC analýzou znázorňuje **Obr. 35** a retenčné časy týchto píkov vrátane plôch pod nimi sú uvedené v **Tab. 1**.



**Obr. 35** Záznam HPLC analýzy látky OX-0e

**Tab. 1** Retenčné časy a plochy pod krivkou jednotlivých píkov z HPLC analýzy látky OX-0e

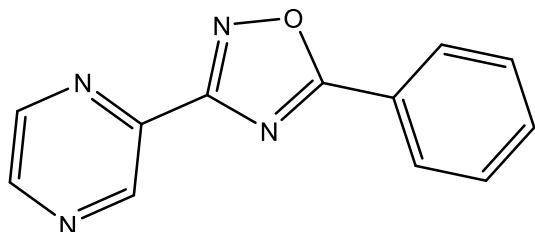
Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	1,787	25922	0,078
2	2,041	30050	0,09
3	4,52	47264	0,142
4	9,15	59821	0,179
5	12,682	32767003	98,268
6	14,352	15177	0,046
7	19,832	125508	0,376
8	19,976	256318	0,769
9	26,559	17500	0,052
Total		33344561	100

IČ spektrum: 2977, 2937, 2877 (alif.), 1585, 1568 (C=N), 1162, 1149 (C=N pyrazin), 1136 (C-O), 1049 (C=C pyrazin), 906 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.22 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, Ar), 8.86-8.83 (2H, m, Ar), 3.44-3.35 (1H, m, CH), 1.39 (6H, d,  $J=6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  185.0, 166.1, 147.2, 145.4, 143.9, 141.9, 27.0, 19.9

### 3.1.2.4 Syntéza 5-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0f)



Na prípravu sa použilo 2,26 g anhydridu kyseliny benzoovej.

Iný postup syntézy je uvedený v časti 3.1.5.1.

Sumárny vzorec:  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$

Relatívna molekulová hmotnosť: 224,22

Vzhľad: biele ihličkovité kryštály

Výťažok reakcie: 1,21 g (54 %)

Teplota topenia: 148,3 °C (ref. 143–145 °C [53]; 160–163 °C [54])

Elementárna analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	64,28	3,60	24,99
<b>Zistené</b>	64,11	3,49	24,87

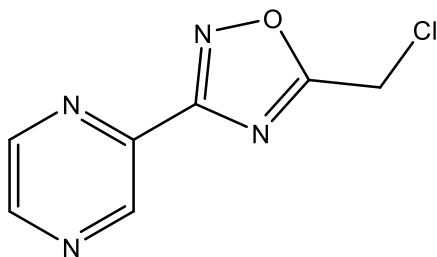
IČ spektrum: 1610, 1560 (C=N), 1161 (C=N pyrazin), 1148 (C-O), 1048 (C=C pyrazin), 915 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.46 (1H, d,  $J= 1.5$  Hz, H3), 8.80 (1H, dd,  $J= 2.4$  Hz,  $J= 1,5$  Hz, H5), 8.75 (1H, d,  $J= 2.4$  Hz, H6), 8.30-8.26 (2H, m, H2', H6'), 7.66-7.62 (1H, m, H4'), 7.60-7,54 (2H, m, H3', H5')

$^{13}\text{C}$ , NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.9, 167.0, 146.4, 144.8, 144.4, 142.4, 133.2, 129.1, 128.4, 123.6

Látka je nerozpustná v DMSO.

### 3.1.2.5 Syntéza 5-chlórmetyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0g)



Na prípravu sa použilo 1,71 g anhydridu kyseliny 2-chlóroctovej.

Sumárny vzorec: C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>4</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 196,59

Vzhľad: svetložltá práškovitá látka

Výťažok reakcie: 1,17 g (60 %)

Teplota topenia: 76,7–79,8 °C (ref. 73–74 °C [54]; 101–103 °C [55])

Elementárna analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	42,77	2,56	28,50
<b>Zistené</b>	43,07	2,45	28,71

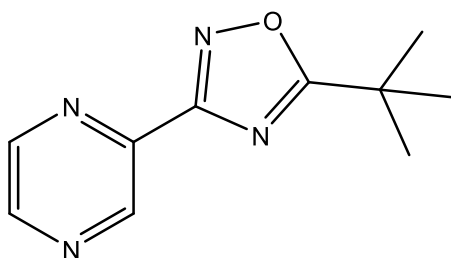
Produkt bol dvakrát rekrystalizovaný z bezvodého ethanolu. Po prvej rekrystalizácii elementárna analýza ukázala prítomnosť nečistôt.

IČ spektrum: 2970 (alif.), 1591, 1571 (C=N), 1168 (C=N pyrazin), 1138 (C-O), 1050 (C=C pyrazin), 904 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.26 (1H, s, Ar), 8.90-8.86 (2H, m, Ar), 5.24 (2H, s, CH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C, NMR (125 MHz, DMSO) δ 176.5, 166.6, 147.5, 145.5, 144.0, 141.4, 33.9

### 3.1.2.6 Syntéza 5-terc-butyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0b)



Na prípravu sa použilo 1,70 ml anhydridu kyseliny pivalovej (1,86 g; ρ= 0,918 g/ml).

Sumárny vzorec: C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O

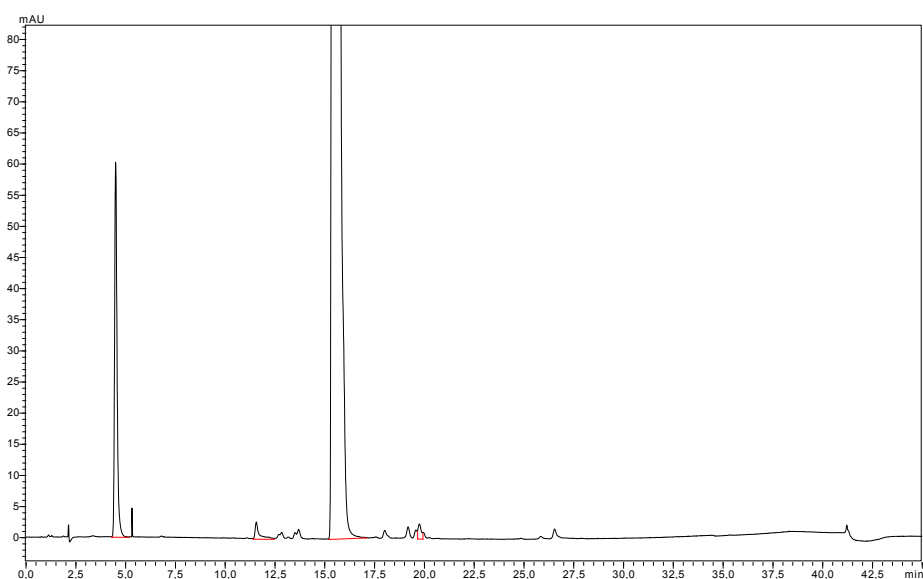
Relatívna molekulová hmotnosť: 204,23

Vzhľad: svetložltá olejovitá látka, pri nižšej teplote netuhne

Výťažok reakcie: 1,83 g (89 %)

Elementárnou analýzou nie je možné overiť čistotu látky, nakoľko sa jedná o kvapalnú vzorku. Látka bola vyčistená na flash chromatografe. Na overenie čistoty bola využitá HPLC analýza, ktorá potvrdila 98% čistotu látky. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 273 nm, pričom sa jedná o absorpčné maximum hlavného píku.

Záznam získaný HPLC analýzou znázorňuje **Obr. 36** a retenčné časy týchto píkov vrátane plôch pod nimi sú uvedené v **Tab. 2**.



**Obr. 36** Záznam HPLC analýzy látky OX-0b

**Tab. 2** Retenčné časy a plochy pod krivkou jednotlivých píkov z HPLC analýzy látky OX-0b

Peak#	Ret. Time	Area	Area%
1	4,527	520611	1,229
2	11,588	35547	0,084
3	15,495	41789204	98,625
4	19,774	26365	0,062
Total		42371727	100

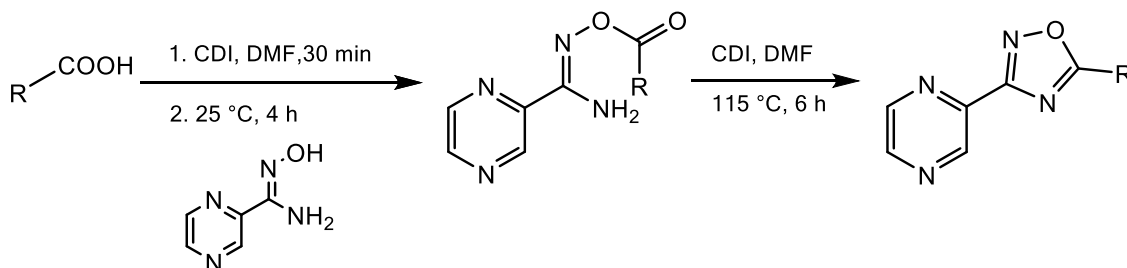
IČ spektrum: 2976, 2874 (alif.), 1570, 1555 (C=N), 1162, 1151 (C=N pyrazin), 1130 (C-O), 1050 (C=C pyrazin), 904 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.23 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, Ar), 8.86-8.83 (2H, m, Ar), 1.46 (9H, s,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  187.2, 166.0, 147.2, 145.3, 143.9, 141.9, 33.6, 28.1

### 3.1.3 Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karboximidamidu a karboxylových kyselín

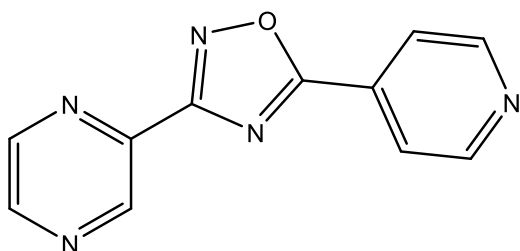
Všeobecný postup:



K 3 ml 0,5 M roztoku príslušnej karboxylovej kyseliny (1,5 mmol) v DMF bolo pridaných 1,65 ml 1,0 M roztoku CDI (1,65 mmol) v DMF. Zmes bola miešaná po dobu 30 minút za laboratórnej teploty a následne boli pridané 3 ml 0,55 M roztoku *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (1,65 mmol; 0,23 g) v DMF a zmes bola miešaná po dobu 4 hodín pri teplote 25 °C. Následne bolo pridaných 1,65 ml 1,0 M roztoku CDI (1,65 mmol) v DMF a reakcia bola zahrievaná pri teplote 115 °C pod spätným chladičom po dobu 6 hodín.

Po ochladení na laboratórnu teplotu bolo pridaných 9 ml vody a 21 ml ethyl-acetátu. Po 10 minútach miešania boli kvapalné fázy oddelené. Organická vrstva bola premytá 9 ml vody, 9 ml 1 M HCl, 9 ml nasýteného roztoku NaHCO<sub>3</sub>, 9 ml nasýteného roztoku chloridu sodného a následne bola vysušená bezvodým síranom sodným. Vodná vrstva bola následne druhýkrát vytrepaná 21 ml ethyl-acetátu, postup premývania organickej vrstvy bol rovnaký. Organické frakcie boli spojené. Na TLC doske boli viditeľné minoritné nečistoty, preto boli látky podrobené deleniu na flash chromatografe.

#### 3.1.3.1 Syntéza 3-(pyrazin-2-yl)-5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OXDI-0v)



Na prípravu sa použilo 0,19 g kyseliny isonikotínovej.

Iný postup syntézy je uvedený v časti 3.1.4.2.

Vo vodnej vrstve vznikol precipitát, ktorý bol odfiltrovaný a poslaný na analýzu. Z organickej vrstvy bol získaný len 1 mg látky, pravdepodobne sa jednalo o vedľajší produkt vznikajúci danou reakciou. Produkt precipitoval vo vodnej fáze.

Sumárny vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 225,21

Vzhľad: žltá práškovitá látka

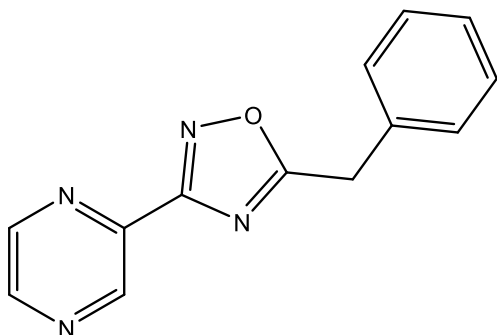
Výťažok reakcie: 20,3 mg (6 %)

Teplota topenia: 197–201,5 °C

Podľa <sup>1</sup>H NMR spektra sa pravdepodobne jedná o štruktúru syntetizovanej látky, no niektoré signály môžu odpovedať prítomným nečistotám.

Získané množstvo látky nebolo dostatočné pre realizáciu skúšok čistoty. Látka bude opätovne syntetizovaná za účelom jej charakterizácie.

### 3.1.3.2 Syntéza 5-benzyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-15)



Na prípravu sa použilo 0,20 g kyseliny fenylactovej. Na základe sledovania reakcie pomocou TLC sa zahrievanie s roztokom CDI ukončilo už po piatich hodinách.

Sumárny vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 238,25

Vzhľad: béžová kryštalická látka

Výťažok reakcie: 0,14 g (39 %)

Teplota topenia: 92,8–94,7 °C

Elementárna analýza:

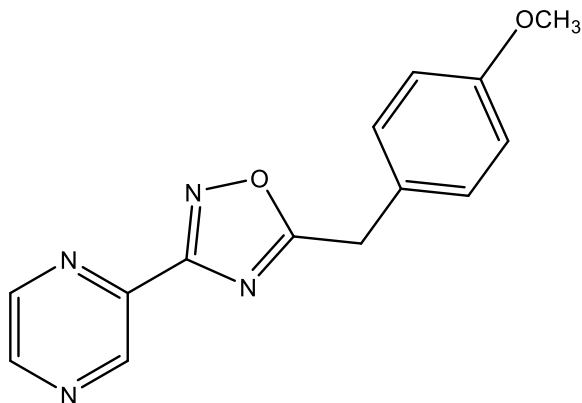
	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	65,54	4,23	23,52
<b>Zistené</b>	65,74	4,23	23,41

IČ spektrum: 2921, 2851 (alif.), 1565 (C=N), 1155 (C=N pyrazin), 1149 (C-O), 1049 (C=C pyrazin), 908 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.22 (1H, d, *J*=1,5 Hz, Ar), 8.86-8.83 (2H, m, Ar), 7.43-7.35 (4H, m, Ar), 7.33-7.29 (1H, m, Ar), 4.49 (2H, s, CH<sub>2</sub>)

$^{13}\text{C}$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  179.9, 166.4, 147.2, 145.4, 144.0, 141.8, 134.0, 129.3, 129.0, 127.6, 32.2

### 3.1.3.3 Syntéza 5-(4-methoxybenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-17)



Na prípravu sa použilo 0,25 g kyseliny 4-methoxyfenoxyoctovej.

Sumárny vzorec:  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$

Relatívna molekulová hmotnosť: 268,28

Vzhľad: svetložltá kryštalická látka

Výťažok reakcie: 0,19 g (47 %)

Teplota topenia: 94,5–98,5 °C

Elementárna analýza:

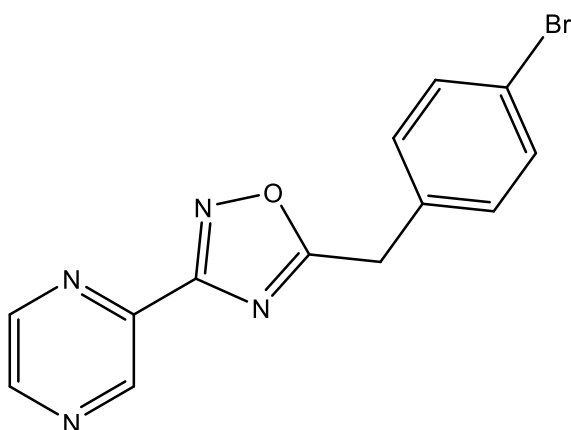
	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	62,68	4,51	20,88
<b>Zistené</b>	62,32	4,45	20,58

IČ spektrum: 2939, 2843 (alif.), 1572 (C=N), 1155 (C=N pyrazin), 1149 (C-O), 1049 (C=C pyrazin), 916 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.22 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, Ar), 8.86-8.82 (2H, m, Ar), 7.35-7.31 (2H, m, AA', BB', Ar), 6.95-6.91 (2H, m, AA', BB', Ar), 4.41 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 3.73 (3H, s,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  180.2, 166.3, 158.8, 147.2, 145.4, 144.0, 141.8, 130.5, 125.8, 114.4, 55.3, 31.4

### 3.1.3.4 Syntéza 5-(4-brómbenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-18)



Na prípravu sa použilo 0,32 g kyseliny 4-brómfenylactovej.

Sumárny vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>BrN<sub>4</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 317,15

Vzhľad: béžová práškovitá tuhá látka

Výťažok reakcie: 0,15 g (32 %)

Teplota topenia: 108,6–111,8 °C

Elementárna analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočítané</b>	49,23	2,86	17,67
<b>Zistené</b>	49,55	2,78	17,60

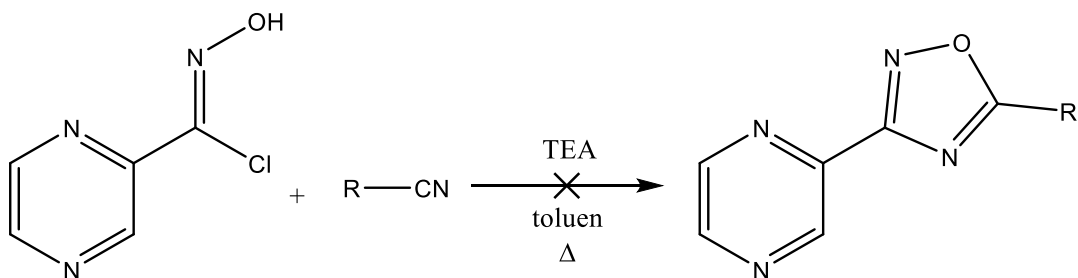
IČ spektrum: 2939 (alif.), 1565 (C=N), 1155 (C=N pyrazin), 1140 (C-O), 1054 (C=C pyrazin), 916 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.22 (1H, bs, Ar), 8.86-8.83 (2H, m, Ar), 7.60-7.56 (2H, m, AA', BB', Ar), 7.41-7.38 (2H, m, AA', BB', Ar), 4.50 (2H, s, CH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C, NMR (125 MHz, DMSO) δ 179.5, 166.4, 147.3, 145.4, 144.0, 141.7, 133.5, 131.8, 131.7, 120.9, 31.5

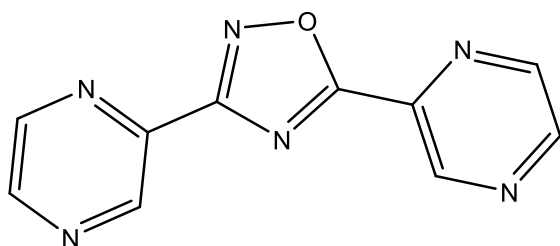
### 3.1.4 Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karbimidoylchloridu a karbonitrilov

Všeobecný postup:



Zmes 1,5 mmol (0,24 g) *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchloridu a 1,5 mmol príslušného aromatického karbonitrilu bola rozpustená v 5 ml toluénu. Roztok triethylamínu (1,5 mmol; 0,21 ml) v 2 ml toluénu bol za miešania pridaný po kvapkách. Zmes bola zahrievaná pri teplote 110 °C pod spätným chladičom po dobu 5 hodín. Po ukončení reakcie bol prefiltrovaný vzniknutý triethylamínhydrochlorid a z filtrátu bol získaný produkt. Reakčná zmes bola podrobená deleniu na flash chromatografe.

#### 3.1.4.1 Syntéza 3,5-di(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OX-0p)



Na prípravu sa použilo 0,13 ml pyrazin-2-karbonitrilu (0,157 g;  $\rho = 1,174$  g/ml).

Sumárny vzorec:  $C_{10}H_6N_6O$

Relatívna molekulová hmotnosť: 226,20

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9.18-9.15 (2H, m, Ar), 8.86 (1H, d,  $J=2,2$  Hz, Ar), 8.78 (1H, d,  $J=2,2$  Hz, Ar), 8.72-8.68 (2H, m, Ar)

$^{13}C$ , NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  154.3, 146.9, 146.2, 145.1, 144.8, 144.6, 144.5, 142.0, 139.6, 113.1

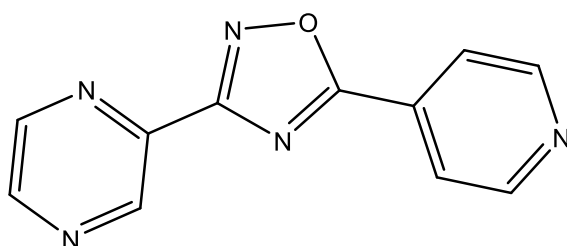
Po delení na flash chromatografe boli získané 2 frakcie. Pomocou TLC bolo zistené, že minoritná frakcia zodpovedá svojím retenčným faktorom východzej látke. Z majoritnej frakcie bolo získaných 130 mg svetložltej kryštalickej látky s teplotou topenia 157,6–159,5 °C. NMR spektrum odpovedalo štruktúre produktu, elementárna analýza nie.

Látka bola dvakrát rekryštalizovaná z bezvodého ethanolu, elementárna analýza nebola ani raz v tolerovaných hodnotách (**Tab. 3**). Po rekryštalizácii vznikol prášok smotanovej farby s teplotou topenia 155,5–156,2 °C.

**Tab. 3** Výsledky elementárnej analýzy OX-0p pred rekryštalizáciou a po nej

<b>Pred rekryštalizáciou</b>				<b>Po rekryštalizácii</b>			
	<b>% C</b>	<b>% H</b>	<b>% N</b>		<b>% C</b>	<b>% H</b>	<b>% N</b>
<b>Vypočítané</b>	53,10	2,67	37,15	<b>Vypočítané</b>	53,10	2,67	37,15
<b>Zistené</b>	50,86	2,67	33,64	<b>Zistené</b>	49,46	34,59	2,15
<b>Rozdiel</b>	<b>-2,24</b>	<b>0,00</b>	<b>-3,51</b>	<b>Rozdiel</b>	<b>-3,64</b>	<b>-0,53</b>	<b>-2,56</b>

### 3.1.4.2 Syntéza 3-(pyrazin-2-yl)-5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-oxadiazolu (OXDI-0v 2)



Na prípravu sa použilo 0,16 g pyridin-4-karbonitrilu. Reakčná zmes bola zahrievaná o hodinu dlhšie, tzn. celkovo 6 hodín, nakoľko po piatich hodinách bola na TLC doske prítomná nezreagovaná východzia látka.

Sumárny vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>5</sub>O

Relatívna molekulová hmotnosť: 225,21

Delenie tejto látky bolo náročnejšie, pretože TLC analýza ukázala vzniknuté 4 produkty, pričom 2 mali pomerne blízke retenčné faktory. Po delení na flash chromatografe boli získané 2 hlavné frakcie, ktoré boli eluované tesne za sebou (**Tab. 4**).

**Tab. 4** Hlavné frakcie po separácii na flash chromatografe, OXDI-0v 2

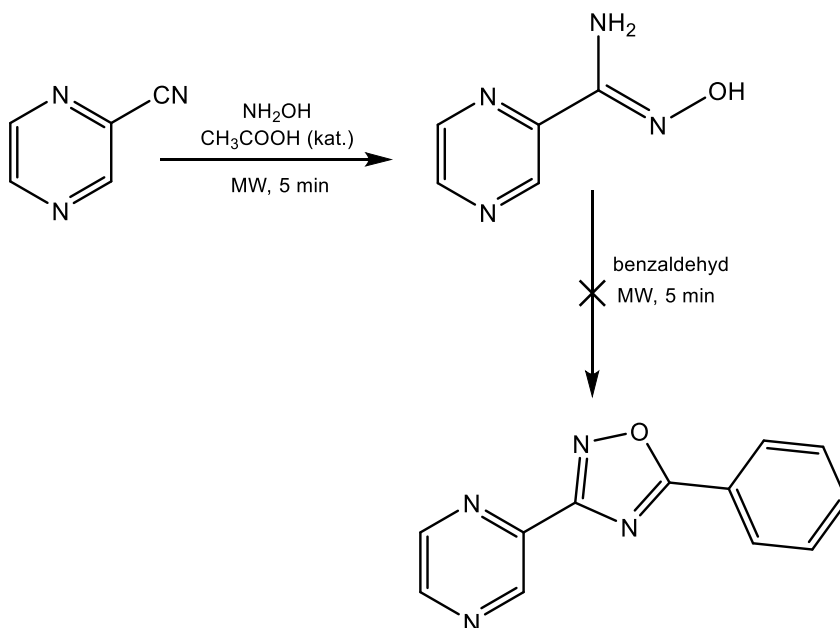
<b>1. frakcia</b>	žltohnedé ihlicovité kryštály	180 mg	t. t. 79,1–82,0 °C
<b>2. frakcia</b>	žltá práškovitá látka	110 mg	t. t. 142,0–147,0 °C

U oboch frakcií bola totožnosť látky zisťovaná NMR analýzou, ani u jednej záznam neodpovedal navrhnutej štruktúre. Látky nevyhovovali elementárnej analýze, ani po rekryštalizácii z bezvodého ethanolu. Analýza sa nezhoduje ani s východzou látkou, ani nezacykleným medziproduktom.

Iný postup syntézy je uvedený v časti **3.1.3.1**.

### 3.1.5 Syntéza 1,2,4-oxadiazolov z karbonitrilu a aldehydov

#### 3.1.5.1 Syntéza 5-fenyl-3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazolu (OXD0-B4)



Pyrazinkarbonitril (0,50 g; 4,75 mmol) a hydroxylamin (0,33 g; 4,75 mmol) boli spolu s 5 kvapkami 99% kyseliny octovej pridané do reakčnej skúmavky. Reakcia prebiehala v CEM mikrovlnnom reaktore pri teplote 150 °C, tlaku 200 Psi a výkone 300 W po dobu 5 minút. Následne bol do reakčnej zmesi pridaný benzaldehyd (0,50 g; 4,75 mmol) a zmes bola zahrievaná po dobu 5 minút za rovnakých reakčných podmienok. Reakcia bola ukončená na základe TLC analýzy, ktorá potvrdila neprítomnosť východzej látky. Reakčná zmes bola vyčistená na flash chromatografe.

Majoritná frakcia (**Tab. 5**) bola poslaná na NMR analýzu, ktorá nepotvrdila totožnosť očakávaného produktu. Elementárna analýza taktiež neodpovedala žiadnému produktu. Z toho dôvodu boli na NMR analýzu odoslané aj ďalšie dve minoritné frakcie získané pri chromatografickom delení, ani u jednej nebola totožnosť danej látky potvrdená. Tretia minoritná frakcia nebola v množstve postačujúcom pre identifikáciu.

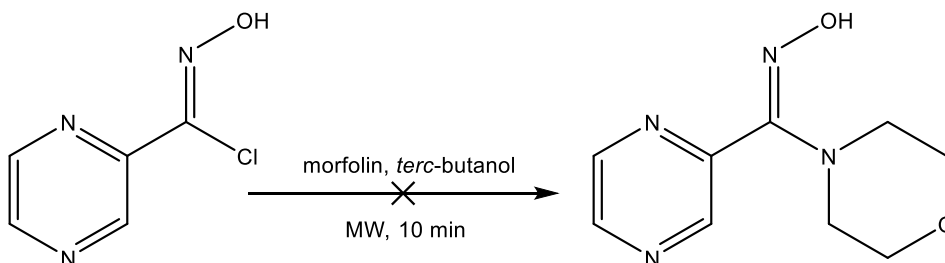
Štruktúrne je látka OXD0-B4 zhodná s látkou OX-0f, ktorá bola úspešne pripravená postupom uvedeným v časti **3.1.2.4**.

**Tab. 5** Frakcie po separácii na flash chromatografe, OXDI-B4

<b>majoritná frakcia</b>	žltá kryštalická látka	60 mg	t. t. nebola meraná
<b>1. minoritná frakcia</b>	žltohnedá kryštalická látka	50 mg	t. t. nebola meraná
<b>2. minoritná frakcia</b>	hnedá kryštalická látka	50 mg	t. t. nebola meraná

### 3.1.6 Syntéza methanon-oximov z karbimidoylchloridu a nasýtených heterocyklov

#### 3.1.6.1 Syntéza morfolín(pyrazín-2-yl)methanon-oximu (MOR-2)



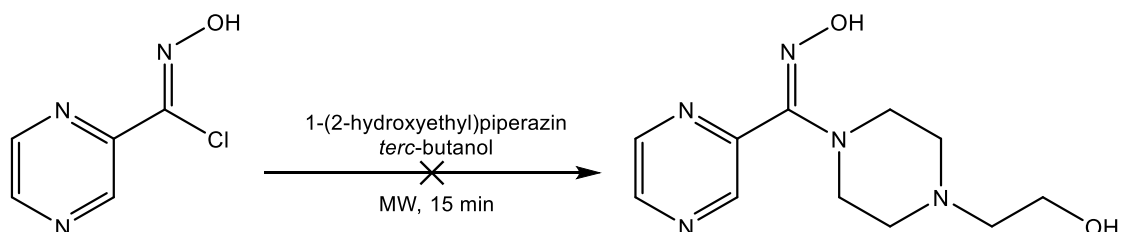
*N'*-hydroxypyrazín-2-karboximidoylchlorid (0,20 g; 1,27 mmol) a morfolín (0,33 ml; 3,81 mmol) boli pridané do reakčnej skúmavky s 3 ml *tert*-butanolu. Reakcia prebiehala v CEM mikrovlnnom reaktore pri teplote 110 °C, tlaku 300 Psi a výkone 200 W. Reakcia bola ukončená po 10 minútach na základe TLC analýzy, ktorá potvrdila neprítomnosť východzej látky. Následne bol *tert*-butanol odparený a reakčná zmes bola vyčistená na flash chromatografe.

Za majoritnú frakciu bola vybraná najvýraznejšie viditeľná zložka na TLC doske. Majoritná frakcia bola poslaná na NMR analýzu, ktorá nepotvrdila totožnosť očakávaného produktu. Elementárna analýza taktiež neodpovedala žiadanému produktu. Z toho dôvodu boli na NMR analýzu odoslané aj ďalšie dve minoritné frakcie získané pri chromatografickom delení (**Tab. 6**), ani u jednej frakcie nebola na základe NMR potvrdená totožnosť danej látky.

**Tab. 6** Získané frakcie po separácii na flash chromatografe, MOR-2

<b>majoritná frakcia</b>	žltá kryštalická látka	70 mg	t. t. za postupného rozkladu od 118,1 °C do 167,6 °C
<b>1. minoritná frakcia</b>	svetložltá kryštalická látka	20 mg	t. t. nebola meraná
<b>2. minoritná frakcia</b>	žltlooranžová polotuhá látka	110 mg	t. t. nebola meraná

### 3.1.6.2 Syntéza (4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)(pyrazin-2-yl)methanon-oximu (HEP-0)



N'-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchlorid (0,20 g; 1,27 mmol) a 1-(2-hydroxyethyl) piperazin (0,47 ml; 3,81 mmol) boli pridané do reakčnej skúmavky s 3 ml *tert*-butanolu. Reakcia prebiehala v CEM mikrovlnnom reaktore pri teplote 110 °C, tlaku 300 Psi a výkone 200 W. Reakcia bola ukončená po 15 minútach na základe TLC analýzy, ktorá potvrdila neprítomnosť východzej látky. Následne bol *tert*-butanol odparený a reakčná zmes bola vyčistená na flash chromatografe.

Majoritná frakcia (**Tab. 7**) bola poslaná na NMR analýzu, ktorá nepotvrdila totožnosť očakávaného produktu. Elementárna analýza taktiež neodpovedala žiadanému produktu. Z toho dôvodu bola na NMR analýzu odoslaná aj ďalšia minoritná frakcia získaná pri chromatografickom delení, u ktorej nebola na základe NMR potvrdená totožnosť danej látky.

**Tab. 7** Frakcie po separácii na flash chromatografe, HEP-0

<b>majoritná frakcia</b>	svetložltá kryštalická látka	40 mg	t. t. 178,0–180,2 °C; tmavne od 158 °C
<b>minoritná frakcia</b>	biela kryštalická látka	30 mg	t. t. 185,0 – 187,0 °C, žltne od 160 °C, hnedne od 175 °C

## 3.2 Biologická časť

Všetky úspešne syntetizované látky boli podrobené testovaniu na ich antibakteriálnu, antimykobakteriálnu a antifungálnu aktivitu.

### Testované zlúčeniny:

- 3.1.2.1. 5-ethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0c)
- 3.1.2.2. 5-propyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0d)
- 3.1.2.3. 5-isopropyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0e)
- 3.1.2.4. 5-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0f)
- 3.1.2.5. 5-chlórmetyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0g)
- 3.1.2.6. 5-*terc*-butyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0b)
- 3.1.3.2. 5-benzyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-15)
- 3.1.3.3. 5-(4-methoxybenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-17)
- 3.1.3.4. 5-(4-brómbenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-18)

### 3.2.1 Vyhodnotenie antimykobakteriálnej aktivity

Aktivita všetkých syntetizovaných látok bola otestovaná *in vitro* proti nasledujúcim kmeňom:

- **MS** *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607)
- **MA** *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366)
- **MTa** *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431)
- **MTv** *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294)
- **MK** *Mycobacterium kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 (ATCC 12478)
- **MAv** *Mycobacterium avium* spp. *avium* Chester CNCTC My 80/72 (ATCC 15769)

Kmene *M. smegmatis* a *M. aurum* boli získané z Nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr (Braunschweig, Nemecko). Atenuovaný kmeň *M. tuberculosis* H37Ra bol získaný z Belgickej koordinovanej zbierky mikroorganizmov (BCCM). Kmene *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* a *M. avium* boli získané z Českej národnej zbierky typových kultúr (CNCTC), Štátny zdravotný ústav (SZÚ), Praha, Česká republika.

## **Antimykobakteriálna aktivita proti *M. smegmatis*, *M. aurum* a *M. tuberculosis* H37Ra:**

Test antimykobakteriálnej aktivity bol realizovaný na Katedre biologických a lekárskeho vied. Na stanovenie aktivity bola použitá mikrodilučná bujónová panelová metóda za použitia 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky. Ako kultivačné médium bol použitý bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) obohatený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) a o 10 % rastového doplnku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, India).

Mykobakteriálne kmene boli kultivované na agare Middlebrook 7H9 a suspenzie boli pripravené v bujóne Middlebrook 7H9. Výsledná hustota bola upravená na hodnotu 1,0 na základe McFarlandovej stupnice a zriedená bujónom v pomere 1:20 pre rýchlo rastúce kmene *M. smegmatis* a *M. aurum* a 1:10 pre *M. tuberculosis* H37Ra.

Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) a následne bol k nim pridaný bujón Middlebrook za účelom získania koncentrácie 2000 µg/ml. Ako štandardy na stanovenie aktivity daných látok boli použité isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacín (CPX) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko).

- **Hodnoty pre testovanie látok OX-0b, OX-0c, OX-0d, OX-0e, OX-0f, OX-0g:**

Finálne koncentrácie boli dosiahnuté binárnym riedením a pridaním mykobakteriálnej suspenzie. Tieto koncentrácie boli stanovené na hodnoty 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,625 – 7,81 – 3,91 µg/ml pre isoniazid; na hodnoty 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,56 – 0,78 – 0,39 – 0,195 – 0,098 µg/ml pre rifampicin a na hodnoty 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,0313 – 0,0156 – 0,0078 µg/ml pre ciprofloxacín.

- **Hodnoty pre testovanie látok OX-15, OX-17, OX-18:**

Finálne koncentrácie boli dosiahnuté binárnym riedením a pridaním mykobakteriálnej suspenzie. Tieto koncentrácie boli stanovené na hodnoty 500 – 250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,625 – 7,81 – 3,91 µg/ml. Isoniazid bol zriedený na hodnoty v rozmedzí 500–3,91 µg/ml pre testovanie aktivity voči rýchlorastúcim kmeňom mykobaktérií a na hodnoty v rozmedzí 1–0,0078 µg/ml pre testovanie aktivity voči *M. tuberculosis* H37Ra. Rifampicin bol zriedený na hodnoty v rozmedzí 50–0,39 µg/ml pre testovanie aktivity voči rýchlorastúcim kmeňom mykobaktérií a na hodnoty v rozmedzí 1–0,0078 µg/ml pre testovanie aktivity voči *M. tuberculosis* H37Ra. Ciprofloxacín bol použitý na testovanie v koncentráciách 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,0313 – 0,0156 – 0,0078 µg/ml.

Finálna koncentrácia DMSO neprekročila 2,5 % (v/v) a neovplyvnila rast *M. smegmatis*, *M. aurum* ani *M. tuberculosis* H37Ra. Do testovania boli zahrnuté aj pozitívne (bujón, DMSO, baktérie) a negatívne (bujón, DMSO) kontroly.

Doštičky boli zakryté polyesterovou adhezívnou fóliou a inkubované v tme bez miešania pri teplote 37 °C. Po 48 hodinách inkubácie *M. smegmatis*, po 72 hodinách inkubácie *M. aurum* a po 120 hodinách inkubácie *M. tuberculosis* H37Ra nasledovalo pridanie 0,01% roztoku sodnej soli resazurínu. Roztok tohto farbiva bol pripravený rozpustením sodnej soli resazurínu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko) v deionizovanej vode tak, aby bol získaný 0,02% roztok. Následne bol pripravený 10% vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko). Obidva roztoky boli zmiešané v rovnakom objemovom pomere a sfiltrované cez membránový filter. Mikrotitračné doštičky boli následne inkubované po dobu ďalších 2,5 hodín za účelom stanovenia aktivity proti *M. smegmatis*, 4 hodiny pre stanovenie aktivity proti *M. aurum* a 24 hodín pre stanovenie aktivity proti *M. tuberculosis* H37Ra.

Antimykobakteriálna aktivita bola vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) a hodnoty boli odčítané na základe farebnej zmeny farbiva (modrá farba – aktívna zlúčenina; ružová farba – neaktívna zlúčenina).

- **Hodnoty MIC pre štandardy – látky OX-0b, OX-0c, OX-0d, OX-0e, OX-0f, OX-0g:**

Hodnoty MIC pre štandardy boli v rozmedzí 7,81–15,625 µg/ml pre INH; 12,5–25 µg/ml pre RIF a 0,0625–0,125 µg/ml pre CPX proti *M. smegmatis* a 1,95–3,91 µg/ml pre INH; 0,78–1,56 µg/ml pre RIF a 0,0078–0,0156 µg/ml pre CPX proti *M. aurum*. Všetky stanovenia boli realizované dvakrát.

- **Hodnoty MIC pre štandardy – látky OX-15, OX-17, OX-18:**

Hodnoty MIC pre štandardy boli v rozmedzí 7,81–15,625 µg/ml pre INH; 12,5–25 µg/ml pre RIF a 0,0625–0,125 µg/ml pre CPX proti *M. smegmatis*. 1,95–3,91 µg/ml pre INH; 0,39–0,78 µg/ml pre RIF a 0,0078–0,0156 µg/ml pre CPX proti *M. aurum*. 0,125–0,25 µg/ml pre INH; 0,0039–0,0078 µg/ml pre RIF a 0,125–0,25 µg/ml pre CPX proti *M. tuberculosis* H37Ra. Všetky stanovenia boli realizované dvakrát.

Výsledky testovaných zlúčenín sú zhrnuté v **Tab. 8**. Aktivita voči *M. tuberculosis* H37Ra bude otestovaná aj u ostatných derivátov.

**Tab. 8** Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) testovaných látok proti *M. smegmatis* (MS), *M. aurum* (MA) a *M. tuberculosis H37Ra* (MTa)

Testovaná látka [kód]	Kmeň (kód)		
MIC [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MS	MA	MTa
OX-0b	<b>62,5</b>	<b>31,25</b>	n
OX-0c	$\geq 500$	$\geq 500$	n
OX-0d	$\geq 500$	$\geq 500$	n
OX-0e	$\geq 500$	$\geq 500$	n
OX-0f	$\geq 500$	$\geq 500$	n
OX-0g	<b>125</b>	<b>15,63</b>	n
OX-15	<b>250</b>	<b>250</b>	125
OX-17	<b>250</b>	$\geq 500$	125
OX-18	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>31,25</b>
INH	7,81–15,63	3,91	0,25
RIF	12,5–25	0,39–0,78	0,0078
CPX	0,0623–0,125	0,0078–0,0156	0,125

n – netestované

**Antimykobakteriálna aktivita proti *M. tuberculosis H37Rv*, *M. kansasii* a *M. avium*:**

Test antimykobakteriálnej aktivity bol realizovaný vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Ako kultivačné médium bol použitý bujón Middlebrook 7H9 obohatený o rastový doplnok AODC (albumín, kyselina olejová, dextróza a kataláza), dodané firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Deklarovaná hodnota pH média bola 6,6. Bola použitá pozitívna kontrola inhibície rastu s INH a negatívna kontrola tvorená živnou pôdou a DMSO.

Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO a nariadené dvojkovým riedením. Koncentrácie skúšaných látok boli 100 – 50 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56  $\mu\text{g/ml}$ . Výsledná koncentrácia DMSO neprekročila 1 % (v/v) a neovplyvňovala rast mykobaktérií. Po piatich dňoch bol pridaný roztok Almar Blue. Výsledky boli interpretované ako hodnota MIC (najnižšia koncentrácia testovanej látky, ktorá zabránila zmene modrého sfarbenia na ružové). Všetky stanovenia boli realizované dvakrát.

Výsledky testovaných zlúčenín sú zhrnuté v **Tab. 9**. Aktivita látky OX-0b bude otestovaná.

**Tab. 9** Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) testovaných látok proti *M. kansasii* (MK), *M. avium* (MAv), a *M. tuberculosis H37Rv* (MTv)

Testovaná látka [kód]	Kmeň (kód) MIC [µg/ml]		
	MK	MAv	MTv
OX-0b	n	n	n
OX-0c	>100	>100	>100
OX-0d	>100	>100	>100
OX-0e	>100	>100	>100
OX-0f	>100	>100	>100
OX-0g	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
OX-15	>100	>100	>100
OX-17	>100	>100	100
OX-18	>100	<b>50</b>	<b>100</b>
INH	12,5	12,5–25	0,2–0,39

n – netestované

### 3.2.2 Vyhodnotenie antibakteriálnej aktivity

Antibakteriálna aktivita pripravených látok bola testovaná na Katedre biologických a lekárskech vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Boli použité kmene z Českej zbierky mikroorganizmov (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno).

#### Testované kmene:

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

Na otestovanie antibakteriálnej aktivity bola použitá mikrodilučná bujónová metóda v doštičkách (200 µl média a 10 µl suspenzie inokula). Všetky kmene boli kultivované na Mueller-Hintonovom bujóne č. 2 (CAMHB, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) pri teplote 35 °C a uchovávané v rovnakom médiu pri teplote 4 °C. Bakteriálne inokulá boli pripravené suspendovaním v 0,85% sterilnom fyziologickom roztoku. Hustota suspenzie bola upravená na 0,5 stupňa McFarlandovej stupnice, tzn.  $1,5 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Testované látky boli rozpustené v DMSO (Sigma-Aldrich,

Steinheim, Nemecko). Antibakteriálna aktivita zlúčenín bola následne stanovená v Mueller-Hintonovom bujóne (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) pri pH 7,0. Kontroly obsahovali len médium a DMSO. Inkubácia prebiehala staticky, v tme a v humidnej atmosfére pri teplote 35 °C.

Konečná koncentrácia DMSO v testovacom médium neprekročila 2,5 % (v/v) a neovplyvňovala prirodzený rast baktérií. Hodnoty MIC boli odčítané po 24 a 48 hodinách, v prípade *Pseudomonas aeruginosa* po 72 a 120 hodinách. Hodnota MIC je vyjadrená ako koncentrácia v  $\mu\text{mol/l}$ , ktorá vyvolá 95% inhibíciu rastu v porovnaní s kontrolou. Ako štandardy boli použité ciprofloxacín (CPX) a gentamicín (GEN). MIC oboch štandardov bola odčítaná po 24 hodinách a taktiež vyjadrená ako najnižšia koncentrácia, ktorá inhibovala 95 % rastu v porovnaní s kontrolou.

Výsledky testovania sú zhrnuté v **Tab. 10**. MIC štandardov uvádza **Tab. 11**.

**Tab. 10** MIC testovaných látok proti uvedeným bakteriálnym kmeňom

Kmeň (kód)		Testovaná látka [kód] - MIC/IC95 [ $\mu\text{mol/l}$ ]								
		OX-0b	OX-0c	OX-0d	OX-0e	OX-0f	OX-0g	OX-15	OX-17	OX-18
SA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
ACI	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tab. 11 MIC štandardov (ciprofloxacín a gentamicín) odčítané po 24 hodinách

Kmeň (kód)	Štandard - MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]	
	CPX	GEN
SA	0,128-0,256	1
MRSA	0,128	16-32
SE	>1,024	>8
EF	0,512	8
EC	0,008	1-2
KP	>1,024	>8
ACI	n.a.	n.a.
PA	0,128	0,5

n.a.– nedostupný údaj (not available)

### 3.2.3 Vyhodnotenie antifungálnej aktivity

Antifungálna aktivita pripravených látok bola testovaná na Katedre biologických a lekárskech vied Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové.

#### Testované kmene:

**CA** (*Candida albicans*, ATCC 24433, CCM 8320)

**CK** (*Candida krusei*, ATCC 6258, CCM 8271)

**CP** (*Candida parapsilosis*, ATCC 22019, CCM 8260)

**CT** (*Candida tropicalis*, ATCC 750, CCM 8264)

**AF** (*Aspergillus fumigatus*, ATCC 204305)

**AF1a** (*Aspergillus flavus*, CCM 8363)

**AC** (*Absidia corymbifera*, CCM 8077 )

**TI** (*Trichophyton interdigitale*, ATCC 9533, CCM 8377)

Na otestovanie antifungálnej aktivity bola použitá mikrodilučná bujónová metóda v doštičkách (200  $\mu\text{l}$  média a 10  $\mu\text{l}$  suspenzie inokula). Kultivácia prebiehala v tkanivovom kultivačnom médiu RPMI 1640 s glutamanom a 2% glukózou, pH tohto média bolo upravené na hodnotu 7,0 pomocou 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonovej kyseliny. Testované látky boli rozpustené v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemecko). Hustota výslednej inokulačnej suspenzie bola  $0,5\text{--}2 \times 10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Inkubácia prebiehala staticky, v tme a v humidnej atmosfére pri teplote 35 °C.

Konečná koncentrácia DMSO v testovacom médiu neprekročila 2,5 % (v/v) a neovplyvňovala rast húb. Hodnoty MIC boli vyjadrené v  $\mu\text{mol/l}$  a boli odčítané po 24 a 48 hodinách kultivácie, v prípade *Trichophyton interdigitale* po 72 a 120 hodinách. Ako štandardy boli použité amfotericin B (AMF-B), flukonazol (FLU) a vorikonazol (VOR). MIC amfotericínu B bola odčítaná ako najnižšia koncentrácia, ktorá inhibovala 90 % rastu v porovnaní s kontrolou, MIC flukonazolu

a vorikonazolu bola odčítaná ako najnižšia koncentrácia, ktorá inhibovala 50 % rastu v porovnaní s kontrolou. Výsledky boli odčítané po 24 hodinách pre kvasinky (všetky kmene *Candida*) a po 48 hodinách pre ostatné kmene húb.

Výsledky testovania sú zhrnuté v **Tab. 12**. MIC štandardov uvádza **Tab. 13**.

**Tab. 12** MIC testovaných látok proti uvedeným kmeňom mikroskopických húb

Kmeň (kód)		Testovaná látka [kód] - MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]								
		OX-0b	OX-0c	OX-0d	OX-0e	OX-0f	OX-0g	OX-15	OX-17	OX-18
CA	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500
CK	24 h	>500	>500	>500	<b>125</b>	>500	<b>62,5</b>	<b>500</b>	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	<b>62,5</b>	>500	>500	>500
CP	24 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	<b>62,5</b>	<b>500</b>	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500
CT	24 h	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	<b>62,5</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500
AF	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500
AFIa	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500
AC	24 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>31,25</b>	>500	>500	>500
	48 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>62,5</b>	>500	>500	>500
TI	72 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>62,5</b>	>500	>500	>500
	120 h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>62,5</b>	>500	>500	>500

**Tab. 13** MIC štandardov (amfotericín B, flukonazol, vorikonazol) odčítané po 24 hodinách pre kmene *Candida* a po 48 hodinách pre ostatné kmene húb

Kmeň (kód)	Štandard - MIC [ $\mu\text{mol/l}$ ]		
	AMF-B	FLU	VOR
CA	0,5	>32	>16
CK	1	>32	0,5
CP	0,5	16	8
CT	1	16	>16
AF	1	>32	1
AFIa	8	>32	>16
AC	0,5	>32	>16
TI	2	32	>16

## 4 DISKUSIA

Táto diplomová práca je zameraná syntézu 5-substituovaných 3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolov. Tuberkulostatickú aktivitu u pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazolov ako prví popísali Pancechowska-Ksepko a kol. [54]. Okrem týchto syntéz boli realizované reakcie na prípravu methanon-oximov.

### **Pre syntézu substituovaných oxadiazolov boli využité nasledujúce reakcie:**

#### **1. Reakcie karboximidamidu s anhydridmi karboxylových kyselín**

Ako medziprodukt pre syntézu daných derivátov bol použitý *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid, ktorý bol pripravený postupom uvedeným v diplomovej práci *Katirtzi* [4]. Tieto syntézy naväzujú na diplomovú prácu *Dzámovej* [7], ktorá pripravila sériu 3-(5-alkylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazolov s rôznymi alifatickými reťazcami na pyrazínovom jadre. V tejto práci boli pripravené deriváty s nesubstituovaným pyrazínom a naopak, alifatické alebo aromatické reťazce boli naviazané na 1,2,4-oxadiazolové jadro.

Cyklizácia amidoximu s anhydridom karboxylových kyselín prebiehala v xyléne patentovaným postupom podľa Fanshawe a Safira [52]. Týmto postupom bolo úspešne pripravených päť derivátov (OX-0b, OX-0c, OX-0e, OX-0f, OX-0g) v dobrých až výborných výťažkoch (54–93 %). Jedinou výnimkou bol derivát Ox-0d, ktorý sa daným postupom nepodarilo pripraviť. Reakciou vznikla zmes štyroch látok, ktoré boli separované pomocou flash chromatografu. Z hlavnej frakcie bolo získaných 1,75 g žltej olejovitej látky, ktorá v chlade vykryštalizovala, no NMR analýza nepotvrdila totožnosť danej látky. Na základe porovnania retenčných faktorov na TLC sa zistilo, že jednu frakciu tvorilo zbytkové množstvo východzej látky (0,18 g *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu). Ostatné frakcie boli v malom množstve, ktoré neumožňovalo ich identifikáciu. Syntéza bola preto opakovaná, ale za iných reakčných podmienok – bez prítomnosti rozpúšťadla a v nadbytku kvapalného anhydridu. Bol použitý postup podľa Clarka [56]. Nezareagovaný anhydrid bol odstránený pridaním vodného roztoku amoniaku do neutrálneho pH. Na odstránenie vody z reakčnej zmesi bol pridaný toluen.

Všetky pevné nasyntetizované látky boli po chromatografickej separácii rekryštalizované z bezvodého ethanolu. OX-0d a OX-0g boli rekryštalizované dvakrát, pretože elementárna analýza ukázala prítomnosť nečistôt po prvej rekryštalizácii. Kvapalné látky OX-0b a OX-0e boli čistené len flash chromatografiou, následne s využitím HPLC bola potvrdená 98% čistota u oboch látok.

Deriváty s postranným alifatickým reťazcom OX-0b, OX-0c, OX-0d, OX-0e a OX-0g mali po odparení rozpúšťadla charakter olejovitých látok. Po uložení do chladničky došlo u OX-0c, OX-0d a OX-0g ku kryštalizácii. Tieto deriváty mali nerozvetvený postranný reťazec (ethyl, propyl, chlórmetyl). Deriváty OX-0b a OX-0e ostali aj pri znížení teploty v kvapalnom stave. Je možné, že za ich kvapalné skupenstvo zodpovedá postranný rozvetvený alifatický reťazec (OX-0b *tert*-butyl, OX-0e isopropyl), ktorý je ich spoločným štruktúrnym znakom. Pre overenie tejto hypotézy by bolo vhodné pripraviť aj iné deriváty s rozvetveným reťazcom. Derivát s postranným aromatickým reťazcom OX-0f jediný nemal charakter olejovitej látky, ale kryštalizoval hneď po odparení rozpúšťadla. Za tieto vlastnosti sú pravdepodobne zodpovedné rôzne postranné reťazce derivátov.

Lipofilita látok bola charakterizovaná pomocou hodnôt rozdeľovacieho koeficientu ( $\log P$ ), vypočítaných v programe ChemDraw 17.1. Hodnoty  $\log P$  týchto derivátov sa pohybujú v rozmedzí 1,32–2,43. Najnižšiu hodnotu  $\log P=1,32$  má látka OX-0c s ethylovým zvyškom, hodnoty  $\log P$  sa zvyšujú s predlžujúcou sa dĺžkou alifatického reťazca alebo jeho rozvetvením, so zavedením halogénu a aromátu, čo vyobrazuje **Tab. 14**. Všetky deriváty svojou hodnotou  $\log P$  spĺňajú Lipinského pravidlo piatich [57].

## 2. Reakcie karboximidamidu s karboxylovými kyselinami

Ako medziprodukt pre syntézu daných derivátov bol použitý *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid, ktorý bol pripravený známym postupom [4]. Tieto syntézy naväzujú na diplomovú prácu *Kolčárkovej* [6], ktorá realizovala jednu reakciu s alifatickou a jednu s aromatickou karboxylovou kyselinou. U reakcie s kyselinou propiónovou bolo z NMR spektra zistené, že sa jedná o zmes obsahujúcu prevažne alifatické zlúčeniny. Reakciou s kyselinou 3-nitrobenzoovou vznikol očakávaný produkt, ktorý bol následne charakterizovaný NMR spektrom a teplotou topenia. Z tohto dôvodu boli v tejto práci použité len aromatické karboxylové kyseliny.

Deriváty OXDI-0v, OX-15, OX-17 a OX-18 boli syntetizované postupom podľa Deeganovej [58]. Boli použité trojnásobné látkové množstvá reaktantov a trojnásobné množstvá roztokov na premývanie organickej vrstvy oproti množstvám uvedeným v danom postupe. Syntéza využíva CDI na aktiváciu karboxylových kyselín, ktoré následne reagujú s príslušným amidoximom v prostredí DMF. Zahrievaním vzniknutých acyl amidoximov dochádza k dehydratácii a vytvoreniu 1,2,4-oxadiazolového cyklu.

Látky OX-15, OX-17 a OX-18 sa podarilo pripraviť v nižších výťažkoch (32–47 %). Tieto látky boli vyčistené na flash chromatografe, z dôvodu nižších

praktických výťažkov neboli rekryštalizované. Elementárnou analýzou bolo preukázané, že chromatografická separácia bola pre požadovanú čistotu postačujúca.

Problematickejšia bola syntéza látky OXDI-0v. V pôvodnom postupe [58] autori uvádzajú ako spôsob získania produktu z DMF prídanie vody a vytrepánie produktu do organickej fázy a jej následné prečistenie vodou a roztokmi kyseliny chlorovodíkovej, hydrogenuhličitanu sodného a chloridu sodného, v uvedenom poradí. Týmto spôsobom bol z organickej vrstvy získaný 1 mg látky. Z takého množstva nebolo možné realizovať NMR ani elementárnu analýzu, ktoré by zistili totožnosť látky, pravdepodobne sa však jednalo o vedľajší produkt. Hneď po pridaní vody do DMF došlo k precipitácii látky v tejto vodnej vrstve. Po prefiltrovaní bolo získaných 20,3 mg (výťažok 6 %) látky, čo bolo množstvo postačujúce na zmeranie teploty topenia a NMR analýzu. Podľa  $^1\text{H}$  NMR spektra sa pravdepodobne jedná o syntetizovanú látku, no niektoré signály mohli odpovedať prítomným nečistotám.

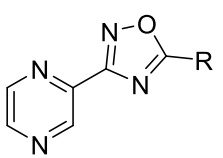
Keďže uvedený postup nebol pre túto reakciu úspešný, boli hľadané iné spôsoby odstránenia DMF z reakčnej zmesi. Na sieti Research Gate [59] popisuje Shailesh Natvarbhai Mistry postup pre izolovanie vzniknutého produktu z DMF. Pre menšie objemy DMF stačí toto rozpúšťadlo zriediť vodou a miešať na magnetickej miešačke po dobu 15 minút. Vzniknutý produkt buď precipituje ako kryštalická látka vo vodnej fáze, z ktorej sa odfiltruje a premyje vodou, alebo ostáva vo forme oleja, ktorý je nutné vytrepať do organického rozpúšťadla. Na odstránenie reziduí DMF je nutné organickú fázu premyť vodou a nasýteným roztokom chloridu sodného. Ďalšie pripravené látky OX-15, OX-17 a OX-18 neprecipitovali vo vodnej zložke, a preto boli vytrepané do ethyl-acetátu, ktorý bol prečistený vodou, roztokmi kyseliny chlorovodíkovej a hydrogenuhličitanu sodného a nasýteným roztokom chloridu sodného, ako uvádza v postupe syntézy Degaanová [58].

Syntéza OXDI-0v bude opakovaná za účelom získania produktu s vyšším praktickým výťažkom, aby bolo možné otestovať aj jeho biologickú aktivitu. Je možné, že produkt bol nesprávne izolovaný, nakoľko bol očakávaný jeho výskyt v organickej fáze. Mistry vo svojom postupe na Research Gate [59] zároveň uvádza, že DMF je vhodné zriediť 10-násobným množstvom vody, čo nebolo dodržané. Dodržanie týchto podmienok by mohlo viesť k lepšiemu výsledku.

Lipofilita látok bola charakterizovaná pomocou hodnôt rozdeľovacieho koeficientu. Najnižšiu hodnotu  $\log P=0,79$  má látka OXDI-0v s pyridinovým substituentom. Deriváty OX-15, OX-17, OX-18 sú lipofilnejšie, ich hodnoty  $\log P$  sa

pohybujú v rozmedzí 2,38–3,34 (**Tab. 14**). Všetky deriváty svojou hodnotou log P spĺňajú Lipinského pravidlo piatich [57].

**Tab. 14** Hodnoty log P vypočítané programom ChemDraw 17.1 Zoradené vzostupne podľa hodnoty log P

Látka	Štruktúra	R	log P
OXDI-0v		pyridin	0,79
OX-0c		ethyl	1,32
OX-0g		chlórmethyl	1,38
OX-0d		propyl	1,74
OX-0e		isopropyl	1,8
OX-0f		fenyl	2,13
OX-17		methoxybenzyl	2,38
OX-0b		terc-butyl	2,43
OX-15		benzyl	2,51
OX-18		brómbenzyl	3,34

### 3. Reakcie karbimidoylchloridu s karbonitrilmi

Medziproduktom pre tieto reakcie bol *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid, ktorý bol pripravený postupom uvedeným v diplomovej práci *Harikovej* [5]. Pripravený chlorid mal vyššiu teplotu topenia ako uvádza vo svojej práci *Hariková* (160 °C, ref. 130 °C), no jeho totožnosť bola potvrdená elementárnou analýzou a porovnaním retenčných faktorov so štandardom na TLC. Rozdiel v teplotách mohol byť spôsobený prítomnosťou zbytkového množstva vody alebo nečistoty, ktoré môžu znížiť teplotu topenia.

Pripravený *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid bol použitý na reakcie s alkylovanými pyrazinkarbonitrilmi s využitím postupu podľa Sangepu [60]. Autori ako rozpúšťadlo použili benzén, ten bol v tejto práci z dôvodu kancerogenity nahradený za toluén. Nie je vylúčené, že zmena rozpúšťadla môže byť príčinou vzniku iných, ako očakávaných produktov. Pre porovnanie je možné uviesť reakcie *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu s anhydridmi karboxylových kyselín v prostredí toluénu v práci *Katirtzi* [4] a v prostredí xylénu v tejto práci (3.1.2). V toluéne nedošlo k zacykleniu na 1,2,4-oxadiazol, zatiaľ čo v xyléne áno. Pre overenie tejto hypotézy by bolo vhodné reakcie zopakovať v inom rozpúšťadle.

### 4. Reakcie karbonitrilu s aldehydmi

Dvojstupňovú syntézu 1,2,4-oxadiazolov v mikrovlnnom reaktore realizovala *Kolčárková* [6] vo svojej práci, ktorej danou reakciou vznikali Schiffove bázy. V tejto práci bol použitý rovnaký postup podľa Adiba [61], ktorého hlavnou výhodou je krátka reakčná doba (1 minúta prvý krok premeny nitrilu na karboximidamid, 3 minúty druhý krok premeny karboximidamidu na 1,2,4-oxadiazol). *Kolčárková* upravila reakčné podmienky

v pôvodnom postupe – jednu reakciu realizovala ako jednostupňovú syntézu s využitím karboximidamidu ako východzej látky, ďalšie reakcie realizovala pri inej teplote a po inú dobu. Cieľom tejto práce bolo realizovať syntézu za rovnakých podmienok, ako sú uvedné v práci od Adiba a kol.

Reakcia bola opakovaná celkom trikrát – prvýkrát sa nepodarilo vzniknutú zmes látok odseparovať na flash chromatografe z dôvodu prístrojovej chyby a druhýkrát reakčná doba a teplota podľa pôvodného postupu od Adiba (1 min, 100 °C pre vznik medziproduktu; 3 min, 150 °C pre vznik finálneho produktu) nebola dostačujúca, TLC analýzou bola zistená prítomnosť nezreagovanej východzej látky a nezreagovaného medziproduktu. Tretíkrát bola reakčná doba zvýšená na 5 minút a teplota na 150 °C u oboch reakcií, pretože použitý mikrovlnný reaktor s fokusovaným poľom dosahoval maximálny výkon 300 W, naproti tomu autori použili reaktor s výkonom 600 W.

Jednotlivé kroky syntézy boli kontrolované TLC. V prvom kroku syntézy bola porovnaním so štandardom na TLC doske potvrdená prítomnosť *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu, ktorý vznikol reakciou pyrazinkarbonitrilu s hydroxylamínom. K tomuto medziproduktu bol v druhom kroku syntézy pridaný benzaldehyd, pričom ďalším zahrievaním malo dôjsť k zacykleniu na 1,2,4-oxadiazol. Po delení zmesi na flash chromatografe boli získané štyri frakcie vo veľmi malých výťažkoch (60 mg, 20 mg, 50 mg, 50 mg), u ktorých NMR spektrum neodpovedalo hľadanej látke.

#### **Pre syntézu methanon-oximov boli využité nasledujúce reakcie:**

Reakcie naväzujú na prácu *Harikovej* [5]. Ako východzia látka bol použitý pripravený *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid. Cieľom reakcií bolo pripraviť rôzne substituované methanon-oximy (MOR-2, HEP-0) jednostupňovou syntézou podľa *Andrša* [62] v mikrovlnnom reaktore. Látku MOR-2 úspešne pripravila *Hariková* [5] odlišným postupom, v inertnom prostredí a v bezvodom dioxane. Jedná sa o laboratórne náročnú syntézu, preto cieľom týchto reakcií bolo nájsť fungujúcu jednoduchšiu metódu syntézy, ktorou by bolo možné pripraviť ďalšiu sériu derivátov.

Reakcie prebiehali v prostredí *tert*-butanolu a ako reaktanty boli použité morfolín (MOR-2) a 1-(2-hydroxyethyl)piperazín (HEP-0). *Andrš* vo svojom postupe uvádza zahrievanie v mikrovlnnom reaktore po dobu 1 hodiny, táto doba bola skrátená na 10 minút. Ihneď po pridaní morfolínu do reakčnej zmesi došlo k prudkej reakcii sprevádzanej únikom plynu a sčernením zmesi. Z toho dôvodu bol reakčný čas skrátený a reakcia bola ukončená na základe TLC, ktorá potvrdila neprítomnosť východzej látky. Po vyčistení na flash chromatografe boli získané tri frakcie, NMR analýza nepotvrdila totožnosť očakávaného produktu v žiadnej z týchto frakcií. U reakcie

s 1-(2-hydroxyethyl)piperazinom nedošlo k tak búrlivej reakcii ako u morfolínu, napriek tomu bola reakcia ukončená po 15 minútach na základe TLC, ktorá opäť potvrdila neprítomnosť východzej látky. Vyčistením zmesi na flash chromatografe boli získané dve frakcie, no NMR analýza nepotvrdila totožnosť očakávanej látky ani v tomto prípade.

### **Zhodnotenie biologickej aktivity:**

Všetky pripravené zlúčeniny boli testované na antibakteriálnu, antifungálnu a antimykobakteriálnu aktivitu proti *M. smegmatis* a *M. aurum* a *M. tuberculosis H37Ra*, ktorá bola vyhodnotená na Katedre biologických a lekárskeho vied. Antimykobakteriálna aktivita proti *M. tuberculosis H37Rv*, *M. avium* a *M. kansasii* bola vyhodnotená vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové.

5-Chlórmethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0g) vykazoval stredne dobrú až slabú antimykobakteriálnu aktivitu v porovnaní so štandardmi. Najvýraznejšie inhiboval rast *M. kansasii* (OX-0g 25 µg/ml; INH 12,5 µg/ml), *M. avium* (OX-0g 25 µg/ml; INH 12,5 µg/ml) a *M. aurum* (OX-0g 15,63 µg/ml; INH 3,91 µg/ml). Aktivita voči *M. smegmatis* (OX-0g 125 µg/ml; INH 15,63 µg/ml) a *M. tuberculosis H37Rv* (OX-0g 25 µg/ml; INH 0,2 µg/ml) bola slabá. Aktivita voči atenuovanému kmeňu *M. tuberculosis* bude testovaná. V porovnaní s rifampicínom a ciprofloxacínom bol inhibičný efekt na *M. aurum* a *M. smegmatis* ešte nižší ako v porovnaní s isoniazidom.

Táto látka vykazovala zároveň antifungálny účinok na niektoré testované kmene húb. V porovnaní s amfotericínom-B je táto aktivita slabá, no v porovnaní s flukonazolom a vorikonazolom je pomerne dobrá. Najvýraznejšie inhibovala látka rast *C. krusei* (OX-0g 62,5 µmol/l; FLU >32 µmol/l), *A. corymbifera* (OX-0g 31,25 µmol/l; po 48 hodinách zvýšenie na 62,5 µmol/l; FLU >32 µmol/l; VOR >16 µmol/l) a *T. interdigitale* (OX-0g 62,5 µmol/l; FLU 32 µmol/l; VOR >16 µmol/l). Naopak, zanedbateľnú aktivitu mala voči *C. albicans* (500 µmol/l) a *A. flavus* (500 µmol/l) a veľmi slabú aktivitu voči *A. fumigatus* (250 µmol/l). Hodnota MIC voči *C. parapsilosis* a *C. tropicalis* bola po 24 hodinách 62,5 µmol/l, no po 48 hodinách aktivita poklesla (250 µmol/l).

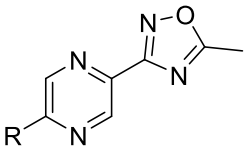
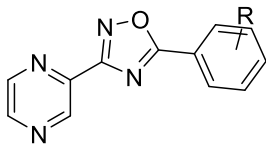
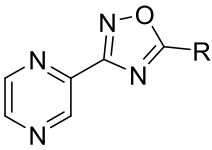
5-Terc-butyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0b) vykazoval stredne dobrú aktivitu na *M. smegmatis* (OX-0b 62,5 µg/ml; INH 15,63 µg/ml; RIF 12,5 µg/ml) a slabšiu na *M. aurum* (OX-0b 31,25 µg/ml; INH 3,91 µg/ml; RIF 0,39 µg/ml). Aktivita voči ostatným kmeňom mykobaktérií bude otestovaná.

5-(4-Brómbenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-18) vykazoval stredne dobrú antimykobakteriálnu aktivitu na *M. avium* (OX-18 50 µg/ml; INH 25 µg/ml) a slabú na atenuovaný kmeň *M. tuberculosis H37Ra* (OX-18 31,25 µg/ml; INH 0,25 µg/ml),

*M. aurum* (OX-18 125 µg/ml; INH 3,91 µg/ml) a *M. smegmatis* (OX-18 62,5 µg/ml; INH 7,81 µg/ml).

Aktívne deriváty vykazujú selektívnu antimykobakteriálnu aktivitu, žiadna pripravená látka nevykazovala inhibičnú aktivitu voči ostatným bakteriálnym ani fungálnym kmeňom. Výnimkou je derivát s chlórmetylovým reťazcom (OX-0g), ktorý mal ako jediný zároveň dobrú antifungálnu aktivitu. Významnú antimykobakteriálnu aktivitu mali celkovo tri látky, derivát s chlórmetylovým reťazcom (OX-0g), s 4-brómbenzylovým reťazcom (OX-18) a s *terc*-butylovým reťazcom (OX-0b).

**Tab. 15** Prehľad látok pripravených v rámci tejto práce a v prácach iných študentov, u ktorých bola testovaná biologická aktivita

<i>Dzámová [7]</i>	<i>Kolčárková [6]</i>	<i>Táto práca</i>
		
<b>Substituenty R</b> <u>alkyl</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• rozvetvený</li> <li>• nerozvetvený</li> </ul>	<b>Sustituenty R</b> <u>fenyl substituovaný</u> <u>v rôznych polohách</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CH<sub>3</sub></li> <li>• NO<sub>2</sub></li> <li>• OCH<sub>3</sub></li> <li>• Cl</li> </ul>	<b>Sustituenty R</b> <u>alkyl</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• rozvetvený</li> <li>• nerozvetvený</li> <li>• halogenovaný (Cl)</li> </ul> <u>aryl</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• fenyl</li> <li>• benzyl</li> <li>▪ nesubstituovaný</li> <li>▪ substituovaný (OCH<sub>3</sub>, Br)</li> </ul>

Pripravené deriváty s nerozvetveným alifatickým uhľovodíkovým reťazcom naviazaným na 1,2,4-oxadiazolovom kruhu boli neaktívne. Deriváty, ktoré syntetizovala *Dzámová [7]* boli substituované rôzne dlhým alifatickým reťazcom na pyrazínovom jadre (**Tab. 15**). Najlipofilnejšie deriváty s najdlhšími alkylovými reťazcami (pentyl, hexyl) boli slabo aktívne len voči *M. smegmatis* (MIC 125 µg/ml). Predĺženie reťazca viedlo k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity, no v porovnaní so štandardmi je aktivita týchto derivátov slabá. Predlžovanie reťazca na pyrazínovom ani 1,2,4-oxadiazolovom kruhu významne nezvyšuje antimykobakteriálnu aktivitu látok.

Jeden pripravený derivát s rozvetveným reťazcom (OX-0e, isopropyl) bol neaktívny, druhý (OX-0b, *terc*-butyl) mal dobrú aktivitu voči *M. smegmatis* (MIC 62,5 µg/ml), a *M. aurum* (MIC 31,25 µg/ml). Z tejto série látok je *terc*-butylový derivát najlipofilnejší (**Tab. 14**), čo pravdepodobne zohráva úlohu v jeho aktivite. Deriváty s rozvetvenými alkylovými reťazcami na pyrazíne (*terc*-butyl, isobutyl, isopropyl), ktoré syntetizovala *Dzámová [7]*, nemali významnú aktivitu. Naproti tomu, derivát s *terc*-butylom na 1,2,4-oxadiazolovom cykle (OX-0b) mal dobrú

antimykobakteriálnu aktivitu. Lokalizácia tohto reťazca na 1,2,4-oxadiazolovom kruhu sa z hľadiska aktivity javí ako výhodnejšia.

Halogenovaný derivát (OX-0g, chlórmetyl) bol najúčinnnejší z látok s postranným alifatickým reťazcom. Zavedenie halogénu zvyšuje antimykobakteriálnu aktivitu.

Derivát s nesubstituovaným fenylom (OX-0f) na 1,2,4-oxadiazolovom jadre nebol aktívny. Kolčárková [6] pripravila deriváty so substituovaným fenylom naviazaným taktiež na 1,2,4-oxadiazolovom kruhu (**Tab. 15**). Substitúcia chlórom v polohe 2 viedla k derivátu aktívnemu proti *M. smegmatis* (MIC 62,5 µg/ml) a *M. aurum* (MIC 125 µg/ml). Presun chlóru do polohy 4 viedol k strate antimykobakteriálnej aktivity. Deriváty s metylom, methoxyskupinou a nitroskupinou na fenyle nemali antimykobakteriálnu aktivitu. Pre antimykobakteriálnu aktivitu je opäť dôležitá substitúcia halogénom, pričom úlohu v aktivite zohráva aj jeho poloha. Derivát s methoxyskupinou bol účinný na testované kmene kvasiniek porovnateľne s flukonazolom.

Deriváty s benzylom na 1,2,4-oxadiazolovom kruhu mali určitú antimykobakteriálnu aktivitu. Derivát s nesubstituovaným benzylom (OX-15) a derivát s benzylom substituovaným methoxyskupinou (OX-17) mali veľmi slabú aktivitu voči *M. smegmatis* (MIC 250 µg/ml), methoxyderivát aj voči *M. aurum* (MIC 250 µg/ml). Substitúcia methoxyskupinou neviedla k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity, podobne ako u Kolčárovej [6]. Derivát s 4-methoxyfenylovým substituentom bol antifungálne aktívny, naproti tomu derivát s 4-methoxybenzylovým nie. Zavedením brómu na benzylový zvyšok v polohe 4 (OX-18) došlo k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity. Pre zhodnotenie vplyvu polohy halogénu na aktivitu by bolo vhodné syntetizovať ďalšie polohové izoméry.

Najaktívnejšie zlúčeniny mali vo svojej štruktúre zavedený halogén (OX-0g chlórmetyl, OX-18 4-brómbenzyl), podobne jediný antimykobakteriálne aktívny derivát u Kolčárovej bol halogenovaný. Halogenácia molekuly zohráva dôležitú úlohu v antimykobakteriálnej aktivite, nezvyšuje však antibakteriálnu aktivitu na iné kmene baktérií. Antifungálne bol aktívny len derivát OX-0g s postranným alifatickým halogenovaným reťazcom. Deriváty s postranným aromatickým halogenovaným reťazcom nemali antifungálnu aktivitu.

## 5 ZÁVER

Bolo pripravených deväť derivátov 1,2,4-oxadiazolu substituovaného v polohe 3 vždy pyrazínom a v polohe 5 rôznymi substituentmi. Šesť látok nebolo doteraz popísaných v literatúre. Popísané boli OX-0c [52], OX-0f [53, 54] a OX-0g [54, 55]. Všetky pripravené látky boli charakterizované teplotou topenia, NMR a IČ spektrom a ich čistota bola overená elementárnou analýzou alebo vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou.

- 5-ethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0c)
- 5-propyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0d)
- 5-isopropyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0e)
- 5-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0f)
- 5-chlórmetyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0g)
- 5-*tert*-butyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0b)
- 5-benzyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-15)
- 5-(4-methoxybenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-17)
- 5-(4-brómbenzyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-18)

Najvyššie výťažky poskytovali reakcie s anhydridmi karboxylových kyselín v prostredí xylénu. O niečo horšie praktické výťažky poskytovali reakcie s karboxylovými kyselinami s využitím CDI. Ich nevýhodou bola aj náročnejšia extrakcia produktu z DMF a pomerne dlhá doba syntézy (10 hodín). Reakcie s karbonitrilmi a reakcia s aldehydom prebiehajúca v mikrovlnnom reaktore neviedli k vzniku očakávaných 1,2,4-oxadiazolov. Nepodarilo sa pripraviť ani methanon-oximy.

Aktívne deriváty vykazovali selektívnu antimykobakteriálnu aktivitu, neboli účinné voči ostatným bakteriálnym ani fungálnym kmeňom. Výnimkou je derivát OX-0g, ktorý ako jediný vykazoval popri antimykobakteriálnej aktivite aj dobrý antifungálny účinok.

Tri látky mali stredne dobrú antimykobakteriálnu aktivitu (OX-18, OX-0b, OX-0g) na viaceré kmene mykobaktérií. Najúčinnjšou látkou z pripravených derivátov je 5-chlórmetyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol (OX-0g), ktorý je do určitej miery aktívny na všetky kmene mykobaktérií. Najvýraznejší inhibičný efekt mal tento derivát na *M. kansasii* a *M. avium*, ktorý bol o polovicu nižší oproti isoniazidu. OX-0g je jediný derivát s antifungálnou aktivitou na niektoré testované kmene húb, na *A. corymbifera* mal efekt ekvipotentný štandardnému flukonazolu.

Ostatné pripravené deriváty nemali významnú antibakteriálnu ani antifungálnu aktivitu.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. *Global Tuberculosis Report 2018*. [online] Geneva: World Health Organisation, 2018, [cit. 2019-07-01]. Dostupné na: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)

2. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017* [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, [cit. 2019-07-01].

Dostupné na: <https://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/tuberkuloza-cr>

3. Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2017 [online]. Národné centrum zdravotníckych informácií, [cit. 2019-02-04].

Dostupné na:

[http://www.nczisk.sk/Statisticke\\_vystupy/Publikacie\\_statisticke\\_prehlady/Zdravotnicke\\_rocenky/Pages/default.aspx](http://www.nczisk.sk/Statisticke_vystupy/Publikacie_statisticke_prehlady/Zdravotnicke_rocenky/Pages/default.aspx)

4. Katirtzi, A. Amidoximes as intermediates for the synthesis of potential drugs. Diplomová práca. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015.

5. Hariková, M. Deriváty amidoximů jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva. Diplomová práca. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2018.

6. Kolčárková, L. Oxadiazoly jako potencionální léčiva II. Diplomová práca. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2018.

7. Džámová, P. Oxadiazoly jako potenciální léčiva. Diplomová práca. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2016.

8. Villemagne, B.; Crauste, C.; Flipo, M.; Baulard, A. R.; Déprez, B.; Willand, N. Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 51, 1–16.

9. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Dirié, B.; Carette, X.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Demirkaya, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Villeret, V.; Christophe, T.; Kyoung Jeon, H.; Locht, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure – Activity Relationship of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 2994–3010

10. Flipo, M.; Desroses, M.; Lecat-Guillet, N.; Villemagne, B.; Blondiaux, N.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Mathys, V.; Flament, M.; Siepmann, J.; Villeret, V.; Wohlkönig, A.; Wintjens, R.; Soror, S. H.; Christophe, T.; Kyoung Jeon, H.; Loch, C.; Brodin, P.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Ethionamide Boosters. 2. Combining Bioisosteric Replacement and Structure-Based Drug Design To Solve Pharmacokinetic Issues in a Series of Potent 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 68–83.
11. Costa-Gouveia, J.; Pancani, E.; Jouny, S.; Machelart, A.; Delorme, V.; Salzano, G.; Iantomasi, R.; Piveteau, C.; Queval, Ch.; Song, O.; Flipo, M.; Deprez, B.; Saint-André, J.; Hureauux, J.; Majlessi, L.; Willand, N.; Baulard, A. R.; Brodin, P.; Gref, R. Combination therapy for tuberculosis treatment: pulmonary administration of ethionamide and booster co-loaded nanoparticles. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*:5390.
12. Prieri, M.; Frita, R.; Probst, N.; Sournia-Saquet, A.; Bourotte, M.; Déprez, B.; Baulard, A. R.; Willand, N. Efficient analoging around ethionamide to explore thioamides bioactivation pathways triggered by boosters in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, *159*, 35–46.
13. Blondiaux, N.; Moune, M.; Desroses, M.; Frita, R.; Flipo, M.; Mathys, V.; Soetaert, K.; Kiass, M.; Delorme, V.; Djaout, K.; Trebose, V.; Kemmer, Ch.; Wintjens, R.; Wohlkönig, A.; Antoine, R.; Huot, L.; Hot, D.; Coscolla, M.; Feldmann, J.; Gagneux, S.; Loch, C.; Brodin, P.; Gitzinger, M.; Déprez, B.; Willand, N.; Baulard, A. R. Reversion of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by spiroisoxazoline SMART-420. *Science*, **2017**, *355* (6330), 1206–1211.
14. Wohlkönig, A.; Remaut, H.; Moune, M.; Tanina, A.; Meyer, F.; Desroses, M.; Steyaert, J.; Willand, N.; Baulard, A. R.; Wintjens, R. Structural analysis of the interaction between spiroisoxazoline SMART-420 and the *Mycobacterium tuberculosis* repressor EthR2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2017**, *487*, 403–408.
15. Tatum, N.; Liebeschuetz, J.; Cole, J.; Frita, R.; Herledan, A.; Baulard, A. R.; Willand, N.; Pohl, E. New active leads for tuberculosis booster drugs by structure-based drug discovery. *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 10245–10255.
16. Kumar, R.; Perumal, S.; Menéndez, J.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. Antimycobacterial activity of novel 1,2,4-oxadiazole-pyranopyridine/chromene hybrids generated by chemoselective 1,3-dipolar cycloadditions of nitrile oxides. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 3444–3450.
17. Kumar, R.; Perumal, S.; Senthilkumar, P.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. An atom efficient, solvent-free, green synthesis and antimycobacterial evaluation of 2-amino-

6-methyl-4-aryl-8-[(E)-arylmethylidene]-5,6,7,8-tetrahydro-4H-pyrano[3,2-c]pyridine-3-carbonitriles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 6459–6462.

18. Jain, P.; Degani, M.; Raju, A.; Anantram, A.; Seervi, M.; Sathaye, S.; Ray, M.; Rajan, M.G.R. Identification of a novel class of quinoline-oxadiazole hybrids as anti-tuberculosis agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 645–649 .

19. Shruthi, T.G.; Eswaran, S.; Shivarudraiah, P.; Narayanan, S.; Subramanian, S. Synthesis, antituberculosis studies and biological evaluation of new quinoline derivatives carrying 1,2,4-oxadiazole moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, 97–102.

20. Mao, J.; Yuan, H.; Wang, Y.; Wan, B.; Pieroni, M.; Huang, Q.; van Breemen., R. B.; Kozikowski, A. P.; Franzblau, S. G. From serendipity to rational antituberculosis drug discovery of mefloquine–isoxazole carboxylic acid esters. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6966–6978.

21. Shruthi, N.; Poojary, B.; Kumar, V.; Hussain, M. M.; Rai, V. M.; Pai, V. R.; Bhat, M.; Revannasiddappa, B. C. Novel benzimidazole–oxadiazole hybrid molecules as promising antimicrobial agents. *RSC. Adv.*, **2016**, 6, 8303–8316.

22. Zorzi, R. R.; Jorge, S. D.; Palace-Berl, F.; Mesquita Pasqualoto, K. F.; de Sa Bortolozzo, L.; de Castro Siqueira, A. M.; Costa Tavares, L. Exploring 5-nitrofurans derivatives against nosocomial pathogens: Synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 2844–2854.

23. Bearman, G.; Doll, M.; Cooper, K.; Stevens, M. P. Hospital Infection Prevention: How Much Can We Prevent and How Hard Should We Try? *Curr. Infect. Dis. Rep.*, **2019**, 21:2.

24. Karad, S. C.; Purohit, V. B.; Thummar, R. P.; Vaghasiva, B. K.; Kamani, R. D.; Thakor, P.; Thakkar, V. R.; Thakkar, S. S.; Ray, A.; Raval, D. K. Synthesis and biological screening of novel 2-morpholinoquinoline nucleus clubbed with 1,2,4-oxadiazole motifs. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 126, 894–909.

25. Sherer, B. A.; Hull, K.; Green, O.; Basarab, G.; Hauck, S.; Hill, P.; Loch III, J. T.; Mullen, G.; Bist, S.; Bryant, J.; Boriack-Sjodin, A.; Read, J.; DeGrace, N.; Uria-Nickelsen, M.; Illingworth, R. N.; Eakin, A. E. Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 7416–7420.

26. Jakopin, Ž.; Ilaš, J.; Barančoková, M.; Brvar, M.; Tammela, P.; Sollner Dolenc, M.; Tomašič, T.; Kikelj, D. Discovery of substituted oxadiazoles as a novel scaffold for DNA gyrase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 130, 171–184.

27. O'Daniel, P.; Peng, Z.; Pi, H.; Testero, S. A.; Ding, D.; Spink, E.; Leemans, E.; Boudreau, M. A.; Yamaguchi, T.; Schroeder, V. A.; Wolter, W. R.; Llarrull, L. I.; Song, W.; Lastochkin, E.; Kumarasiri, M.; Antunes, N. T.; Espahbodi, M.; Lichtenwalter, K.; Suckow, M. A.; Vakulenko, S.; Mobashery, S.; Chang, M. Discovery of a New Class of Non- $\beta$ -lactam Inhibitors of Penicillin-Binding Protein with Gram-Positive Antibacterial Activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 3664–3672.
28. Janardhanan, J.; Chang, M.; Mobashery, S. The oxadiazole antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2016**, 33, 13–17.
29. Ding, D.; Boudreau, M. A.; Leemans, E.; Spink, E.; Yamaguchi, T.; Testero, S. A.; O'Daniel, P. I.; Lastochkin, E.; Chang, M.; Mobashery, S. Exploration of the structure-activity relationship of 1,2,4-oxadiazole antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, 25, 4854–4857.
30. Spink, E.; Ding, D.; Peng, Z.; Boudreau, M. A.; Leemans, E.; Lastochkin, E.; Song, W.; Lichtenwalter, K.; O'Daniel, P. I.; Testero, S. A.; Pi, H.; Schroeder, V. A.; Wolter, W. R.; Antunes, N. T.; Suckow, M. A.; Vakulenko, S.; Chang, M.; Mobashery, S. Structure-Activity Relationship for the Oxadiazole Class of Antibiotics. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 1380–1389.
31. Leemans, E.; Mahasenan, K. V.; Kumarasiri, M.; Spink, E.; Ding, D.; O'Daniel, P. I.; Boudreau, M. A.; Lastochkin, E.; Testero, S. A.; Yamaguchi, T.; Lee, M.; Heseck, D.; Fisher, J. F.; Chang, M.; Mobashery, S. Three-dimensional QSAR analysis and design of new 1,2,4-oxadiazole antibacterials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 1011–1015.
32. Carter, G. P.; Harjani, J. R.; Li, L.; Pitcher, N. P.; Nong, Y.; Riley, T. V.; Williamson, D. A.; Stinear, T. P.; Baell, J. B.; Howden, B. P. 1,2,4-Oxadiazole antimicrobials act synergistically with daptomycin and display rapid kill kinetics against MDR *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2018**, 73, 1562–1569.
33. Kumar, K. S.; Daniel, V.; Shanker Kaki, S.; Prasad Rao, Ch.; Krupadanam, D. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel urea derivatives from chromene based oxadiazole amines. *Med. Chem. Res.*, **2016**, 25, 2179–2186.
34. Shi, G.; He, X.; Shang, Y.; Xiang, L.; Yang, C.; Han, G.; Du, B. Synthesis of 3',4'-Diaryl-4'H-spiro[indoline-3,5'-[1',2',4']-oxadiazol]-2-ones via DMAP-catalyzed Domino Reactions and Their Antibacterial Activity. *Chin. J. Chem.*, **2016**, 34, 901–909.

35. Cunha, F. S.; Nogueira, J. M. R.; de Aguiar, A. P. Synthesis and Antibacterial Evaluation of 3,5-Diaryl-1,2,4-oxadiazole Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2018**, 29, 2405–2416.
36. Sadek, B.; Salem Fafelelbom, K. M. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Evaluation of Oxadiazole Congeners. *Molecules*, **2011**, 16, 4339–4347.
37. Sangshetti, J. N.; Nagawade, R. R.; Shinde, D. B. Synthesis of novel 3-(1-(1-substituted piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one as antifungal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 3564–3567.
38. Sangshetti, J. N.; Shinde, D. B. Synthesis of some novel 3-(1-(1-substituted piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-5-substituted phenyl-1,2,4-oxadiazoles as antifungal agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 1040–1044.
39. Krolenko, K. Y.; Vlasov, S. V.; Zhuravel, I. A. Synthesis and antimicrobial activity of 5-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazole derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2016**, 52, 823–830.
40. Yerande, S. G.; Ghaisas, A. B.; Newase, K. M.; Wang, W.; Wang, K.; Dömling, A. (3+2) Annulation of Amidinothioureas with Binucleophile: Synthesis and Antimicrobial Activity of 3-Phenylamino-5-aryl/alkyl-1,2,4-oxadiazole Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.*, **2014**, 51, 1752–1756.
41. Krishna, Ch.; Bhargavi, M. V.; Rao, Ch. P.; Krupadanam, G. L. D. Synthesis and antimicrobial assessment of novel coumarins featuring 1,2,4-oxadiazole. *Med. Chem. Res.*, **2015**, 24, 3743–3751.
42. Xu, L.-L.; Zhu, J.-F.; Xu, X.-L.; Zhu, J.; Li, L.; Xi, M.-Y.; Jiang, Z.-Y.; Zhang, M.-Y.; Liu, F.; Lu, M.; Bao, Q.-Ch.; Li, Q.; Zhang, Ch.; Wei, J.-L.; Zhang, X.-L.; Zhang, L.-S.; You, Q.-D.; Sun, H.-P. Discovery and Modification of in Vivo Active Nrf2 Activators with 1,2,4-Oxadiazole Core: Hits Identification and Structure-Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 5419–5436.
43. Xu, L.-L.; Wu, Y.-F.; Wang, L.; Li, C.-C.; Li, L.; Di, B.; You, Q.-D.; Jiang, Z.-Y. Structure-activity and structure-property relationships of novel Nrf2 activators with a 1,2,4-oxadiazole core and their therapeutic effects on acetaminophen (APAP)-induced acute liver injury. *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 157, 1376–1394.

44. Xu, L.-L.; Liu, T.; Wang, L.; Li, L.; Wu, Y.-F.; Li, C.-C.; Di, B.; You, Q.-D.; Jiang, Z.-Y. 3-(1H-Benzo[d]imidazol-6-yl)-5-(4-fluorophenyl)-1,2,4-oxadiazole (DDO7232), a Novel Potent Nrf2/ARE Inducer, Ameliorates DSS-Induced Murine Colitis and Protects CM460 Cells against Oxidative Stress via ERK1/2 Phosphorylation. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2018**, 2018, 1–16.
45. Gobec, M.; Tomašič, T.; Markovič, T.; Mlinarič-Raščan, I.; Dolenc, M. S.; Jakopin, Ž. Antioxidant and anti-inflammatory properties of 1,2,4-oxadiazole analogs of resveratrol. *Chem.-Biol. Interact.*, **2015**, 240, 200–207.
46. Yatam, S.; Gundla, R.; Jadav, S. S.; Pedavenkatagari, N. R.; Chimakurthy, J.; Rani B, N.; Kedam, T. Focused library design and synthesis of 2-mercapto bezothiazole linked 1,2,4-oxadiazoles as COX-2/5-LOX inhibitors. *J. Mol. Struct.*, **2018**, 1159, 193–204.
47. Yatam, S.; Jadav, S. S.; Gundla, R.; Gundla, K. P.; Reddy, G. M.; Ahsan, M. J.; Chimakurthy, J. Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2(((5-aryl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)methyl)thio)benzo[d]oxazoles: New Antiinflammatory and Antioxidant Agents. *ChemistrySelect*, **2018**, 3, 10305–10310.
48. Mouchlis, V. D.; Limnios, D.; Kokotou, M. G.; Barbayianni, E.; Kokotos, G.; McCammon, J. A.; Dennis, E. A. Development of Potent and Selective Inhibitors for Group VIA Calcium-Independent Phospholipase A2 Guided by Molecular Dynamics and Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem.*, **2016**, 59, 4403–4414.
49. Challa, K.; Bhargavi, M. V.; Krupadanam, G. L. D. Design, semisynthesis and cytotoxic activity of novel ester derivatives of betulinic acid-1,2,4 oxadiazoles. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2016**, 18, 1158–1168.
50. Krishna, C.; Bhargavi, M. V.; Krupadanam, G. L. D. Design, Synthesis, and Cytotoxicity of Semisynthetic Betulinic Acid-1,2,4-Oxadiazole Amide Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.*, **2018**, 88, 312–318.
51. Yang, F.; Shan, P.; Zhao, N.; Ge, D.; Zhu, K.; Jiang, Ch.-S.; Li, P.; Zhang, H. Development of hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors containing 1,2,4-oxadiazole moiety core with antitumor activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, 15–21.
52. Fanshawe, W. J.; River, P.; Safir, S. R.; Edge, R. Cyclopropyl-1,2,4-oxadiazolylpyrazines. U. S. Patent 3,770,739, 1973.

53. Grant, D.; Dahl, R.; Crosford, N. D. P. Rapid multistep synthesis of 1,2,4-oxadiazoles in a single continuous microreactor sequence. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 7219–7223.
54. Pancechowska-Ksepko, D.; Foks, H.; Janowiec, M.; Zwolska-Kwiek, Z. Pyrazine derivatives. XX. synthesis and tuberculostatic activity of 3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazole derivatives. *Acta Pol. Pharm.*, **1986**, 43, 211–7.
55. Bora, R. O.; Jadhav, G. R.; Kale, R. P.; Dabhade, S. K.; Gill, C. H.; Farooqui, M. Molecular sieves-assisted synthesis of novel 3-chloromethyl-5-substituted pyridine-[1,2,4]-oxadiazoles. *Indian J. Heterocycl. Chem.*, **2008**, 18, 189–190.
56. Clarke, K. The synthesis of 1:2:4-Oxadiazoles. *J. Chem. Soc.*, **1954**, 0, 4251–4253.
57. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1997**, 23, 3–25.
58. Deegan, T. L.; Nitz, T. J.; Cebzanov, D.; Pufko, D. E.; Porco, J. A. Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 209–212.
59. [cit. 2018-09-26].  
[https://www.researchgate.net/post/How\\_can\\_I\\_separate\\_a\\_compound\\_from\\_DMF](https://www.researchgate.net/post/How_can_I_separate_a_compound_from_DMF)
60. Sangepu, B.; Gandu, B.; Anupoju, G.; Jetti, V. Synthesis of Isoxazole, 1,2,4-Oxadiazole and (1*H*-Pyrazol-4-yl)-methanone Oxime Derivatives from *N*-Hydroxy-1*H*-pyrazole-4-carbimidoyl Chloride and their Biological Activity. *J. Heterocyclic Chem.*, **2016**, 53, 754–761.
61. Adib, M.; Jahromi, A. H.; Tavoosi, N.; Mahdavi, M.; Bijanzadeh, H. R. Microwave-assisted efficient, one-pot, three-component synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.*; **2006**, 47, 2965–2967.
62. Andrš, M. Investigation of compounds affecting the neoplastic cell changes. Dizertačná práca. Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotníctví, Hradec Králové, 2017.