

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra organické a bioorganické chemie



**Syntéza a hodnocení potenciálních antituberkulotik
odvozených od isoniazidu**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Kateřina Kučerová

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat všem lidem, díky kterým mohla tato diplomová práce vzniknout, a to především mému vedoucímu práce, doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Václavu Pflégrovi za jeho cenné praktické rady.

Práce byla podpořena grantem Grantové agentury ČR č. 20-19638Y (Design a studium nových antimikrobních látek účinných na rezistentní a biofilm-produkující gram-pozitivní bakterie).

Abstrakt

Isoniazid je léčivo první linie používané proti tuberkulóze. Jedná se o baktericidní léčivo se selektivitou pro *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*). Mechanismus účinku je primárně založen na blokování syntézy mykolových kyselin, a tedy výstavby buněčné stěny. Vývoj rezistence omezuje terapeutický potenciál isoniazidu a z toho důvodu jsou zapotřebí nové strukturální modifikace, které by mohly problém vyřešit.

Tato práce je zaměřena na syntézu a hodnocení nových analog isoniazidu na bázi jeho hydrazonu s kyselinou glyoxalovou. Volná karboxylová skupina byla dále modifikována různými aminy za vzniku amidů. Bylo připraveno celkem šestnáct substituovaných *N*-fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů a byla testována jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivita na vybraných kmenech mykobakterií – *Mtb.*, *M. avium* a *M. kansasii*. Nejlepší aktivita proti *Mtb.* byla prokázána u (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-*N*-(4-propylfenyl)acetamidu a u (*E*)-*N*-(4-butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu, jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) je 0,125 μM ve srovnání s MIC isoniazidu 0,5 μM . Sloučeniny byly aktivní také proti netuberkulózní mykobakterii *M. kansasii* (MIC od 2 μM). Aktivita vůči multirezistentním kmenům byla nižší, sloučeniny vykazují zkříženou rezistenci s parentním isoniazidem.

Klíčová slova

Amidy, glyoxalová kyselina, hydrazidy, hydrazony, isoniazid, mykobakterie, tuberkulóza

Abstract

Isoniazid is a first-line drug used against tuberculosis. It is a bactericidal drug with a selectivity for *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*). The mechanism of action is primarily based on the blockade of mycolic acid synthesis and thus cell wall synthesis. The development of resistance is limiting the therapeutic potential of isoniazid and that is the reason for the development of its new structural modifications.

This diploma thesis is focused on synthesis and evaluation of novel isoniazid analogues based on a hydrazone obtained from isoniazid and glyoxalic acid. The free carboxyl group was further modified by various amines to form amides. A total of sixteen substituted 2-(2-isonicotinoylhydrazono)-*N*-phenylacetamides were prepared and tested for their *in vitro* antimycobacterial activity on selected strains of mycobacteria – *Mtb.*, *M. avium* and *M. kansasii*. The best activity against *Mtb.* was shown by (*E*)-2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene)-*N*-(4-propylphenyl)acetamide and (*E*)-*N*-(4-butylphenyl)-2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene)acetamide, their minimal inhibitory concentration (MIC) is 0.125 μM compared to isoniazid's MIC of 0.5 μM . They were also active against nontuberculous mycobacterium *M. kansasii* (MIC from 2 μM). Their activity against multidrug-resistant strains was lower due to cross-resistance with parent isoniazid.

Keywords

Amides, glyoxalic acid, hydrazides, hydrazones, isoniazid, mycobacteria, tuberculosis

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část	10
2.1	Epidemiologie	10
2.2	Diagnostika	10
2.2.1	Laboratorní vyšetření	10
2.2.2	Zobrazovací vyšetření	11
2.2.3	Imunologické metody	11
2.3	Strategie léčby	11
2.3.1	Isoniazid	12
2.3.2	Rifampicin	13
2.3.3	Pyrazinamid	13
2.3.4	Ethambutol	13
2.3.5	Streptomycin	14
2.4	Strategie léčby rezistentní tuberkulózy	14
2.4.1	Nová antituberkulotika	15
2.4.2	Fluorochinolony	16
2.4.3	Injekční léčiva druhé linie (aminoglykosidy)	16
2.4.4	Ostatní léčiva druhé linie	17
2.5	Bakteriální rezistence	18
2.5.1	Rezistence na antituberkulotika	18
2.6	Modifikace isoniazidu	20
2.6.1	Hybridní sloučeniny isoniazidu	20
2.6.2	Deriváty na bázi hydrazid-hydrazonu isoniazidu	22
2.6.3	Oxadiazoly odvozené od isoniazidu	25
3	Cíl práce	26
4	Experimentální část	27
4.1	Chemická část	27
4.1.1	Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny (66)	28
4.1.2	Příprava <i>N</i> -fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů	29
4.1.2.1	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-Fluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	31
4.1.2.2	(<i>E</i>)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(3-jodfenyl)acetamid	32

4.1.2.3	(E)-N-(3,4-Difluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid.....	33
4.1.2.4	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethyl)fenyl]acetamid	34
4.1.2.5	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethoxy)fenyl]acetamid	35
4.1.2.6	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(3-nitrofenyl)acetamid.....	36
4.1.2.7	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(m-tolyl)acetamid	37
4.1.2.8	(E)-N-(3,4-Dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	38
4.1.2.9	(E)-N-(3,5-Dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	39
4.1.2.10	(E)-N-(4-Ethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid.....	40
4.1.2.11	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(4-propylfenyl)acetamid.....	41
4.1.2.12	(E)-N-(4-Butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid.....	42
4.1.2.13	(E)-N-[4-(Terc-butyl)fenyl]-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	43
4.1.2.14	(E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(4-pentylfenyl)acetamid	44
4.1.2.15	(E)-N-(4-Decylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	45
4.1.2.16	(E)-N-(4-Dodecylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid	46
4.2	Biologická část	47
4.2.1	Hodnocení antimykobakteriální aktivity (68).....	47
5	Výsledky a diskuze	49
5.1	Chemická část	49
5.2	Biologická část	51
5.2.1	Výsledky hodnocení aktivity proti <i>Mtb.</i> , <i>M. avium</i> a <i>M. kansasii</i>	51
5.2.2	Výsledky hodnocení aktivity proti rezistentním kmenům	52
5.3	Diskuze – biologická část.....	52
6	Závěr	54
7	Seznam obrázků.....	55
8	Seznam tabulek.....	57
9	Reference	58

Seznam symbolů a zkratek

ACP	acyl carrier protein
ATP	adenosintrifosfát
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC.HCl	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
HOBt	1-hydroxybenzotriazol hydrát
IGRA	Interferon Gamma Release Assay
INH	isoniazid
INHA	2-(2-isonikotinoylhydrazono)octová kyselina
IR	infračervená spektroskopie
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
<i>Mtb.</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
R_f	retenční faktor
TBC	tuberkulóza
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza

1 Úvod

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené infekční onemocnění, které je vyvolané pro člověka obligátně patogenními mykobakteriemi skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. I přes dlouhodobé zkušenosti s léčbou způsobí tuberkulóza každoročně okolo 1,4 milionu úmrtí. (1)

Hlavním postiženým orgánem bývají plíce, ale tuberkulóza může postihnout jakýkoliv orgán. Ve většině případů se tuberkulóza přenáší vzduchem od osoby k osobě, například při kašli, mluvení a kýchání. Vyšší riziko nákazy mají lidé s oslabeným imunitním systémem. K projevům akutního onemocnění patří trvalý produktivní kašel, v některých případech vykašlávání krve, horečka, hubnutí, bolest na hrudi a dušnost.

Na území České republiky je epidemiologická situace velmi dobrá. Nízká incidence i prevalence je dána kvalitní léčbou, izolací nemocných po dobu infekčnosti a také povinným očkováním v minulosti. Nejvíce případů se vyskytuje v zemích třetího světa, především v zemích Afriky, střední Asie, Jižní Ameriky a východní Evropy.

Nekomplikovaná tuberkulóza je léčena minimálně šest měsíců. Mykobakterie mají oproti jiným bakteriím málo propustnou buněčnou stěnu a pomalu se dělí, proto je nutné podávání léčiv po tak dlouhou dobu. Tuberkulóza je léčitelné onemocnění, ale stále větším problémem se stává získaná bakteriální rezistence, v jejímž důsledku bakterie není dále citlivá na antibiotikum, na které původně citlivá byla. Rezistence se zvyšuje zejména nesprávným užíváním a nadužíváním antimikrobních látek.

Kvůli přibývání případů rezistentní tuberkulózy je neustále potřeba vyvíjet nová léčiva, která by proti těmto formám TBC byla účinná. Tato diplomová práce má za cíl syntézu, charakterizaci a hodnocení antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik odvozených od isoniazidu (INH).

2 Teoretická část

2.1 Epidemiologie

Odhaduje se, že zhruba čtvrtina světové populace je infikovaná bakterií způsobující tuberkulózu, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb.*) komplex. (2) Z infikovaných osob onemocní během života méně než 10 %, zbylých 90 % má tzv. latentní tuberkulózní infekci, která může znamenat riziko vzplanutí nemoci v případě výrazného oslabení imunitního systému. (3) Latentní infekce se neprojevuje klinickými příznaky, ale je riziková tím, že může přejít do aktivní formy. Incidence se pohybuje od méně než 5 případů do více než 500 nových případů na 100 000 obyvatel za rok. (1)

Tuberkulózou každý rok onemocní asi 10 milionů lidí a každý rok způsobí okolo 1,5 milionu úmrtí. (4) Smrtnost tuberkulózy je 16 %. (1) V roce 2017 byly hlášeny dvě třetiny všech případů tuberkulózy jen z osmi zemí světa (Bangladéš, Čína, Indie, Indonésie, Nigérie, Pákistán, Filipíny a Jihoafrická republika). V Evropě tuberkulóza postihuje hlavně zranitelné populace – migranty, bezdomovce, vězně, lidi pozitivní na virus lidské imunitní nedostatečnosti apod. (5)

2.2 Diagnostika

Plicní forma tuberkulózy postihuje plicní parenchym. Mimoplicní tuberkulóza postihuje jiné orgány než plíce, např. pleuru, lymfatické uzliny, urogenitální trakt, klouby, kůži, kosti nebo nervový systém. (6) Plicní tuberkulóza se projevuje trvalým produktivním kašlem, v některých případech vykašlávání krve, zvýšenou teplotou až horečkou, hubnutím, únavou, bolestí na hrudi a dušností. Projevy mimoplicní tuberkulózy se liší podle napadeného orgánu. Za jednoznačný důkaz onemocnění se považuje kultivace mykobakterií.

2.2.1 Laboratorní vyšetření

Mykobakterie se dokazují z odebraného biologického materiálu, například ze sputa. *Mycobacterium tuberculosis* je acidorezistentní tyčka, kterou lze přímo v biologickém materiálu během několika hodin prokázat pomocí fluorescenčního barvení. Kultivační vyšetření probíhá na pevných i tekutých půdách. Kvůli dlouhé generační době

mykobakterií trvá kultivační vyšetření 6–9 týdnů. S laboratorním vyšetřením mykobakterií se provádí stanovení citlivosti na antituberkulotika první a druhé řady. (7)

Kromě klasické kultivace a mikroskopie existují modernější, urychlené kultivace. Je možné detekovat metabolické produkty mykobakterií nebo detekovat spotřebu kyslíku, případně je možné měřit množství uvolněného oxidu uhličitého u mykobakterií, které aktivně metabolizují. (3) (6)

Možné je také histopatologické vyšetření biopsie postižené tkáně. V histologickém vzorku se prokazují buňky typické pro granulomatózní zánět. (6)

2.2.2 Zobrazovací vyšetření

Mezi klasická zobrazovací vyšetření patří rentgen hrudníku. Nález ložiska na plicích je charakteristický, ale neznamená definitivní potvrzení diagnózy. Výpočetní tonografie a magnetická rezonance se používá v případě mimoplicní formy. (8)

2.2.3 Imunologické metody

Díky imunologickým metodám je možné nepřímo diagnostikovat přítomnost *Mtb.* Jednou z možností je tuberkulinový test, kdy se do kůže aplikuje čištěný protein tuberkulin, který produkují mykobakterie. Hodnotí se průměr léze, která vznikne dva až tři dny po aplikaci. Test odhalí, jestli se člověk setkal s *Mtb.*, takže test vychází pozitivně i očkovaným lidem. (9)

IGRA testy (Interferon Gamma Release Assay) jsou metody fungující na základě měření produkce interferonu gama, který je produkován specifickými lymfocyty, pokud přišly do kontaktu s *Mtb.* V těchto metodách se používají antigeny vyskytující se v buňkách *Mtb.*, nikoliv ve vakcínách, a měření je prováděno v krvi odebrané od pacienta. (10)

2.3 Strategie léčby

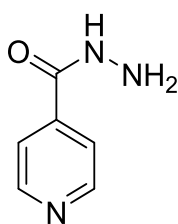
Nekomplikovaná tuberkulóza je léčena minimálně šest měsíců, neboť mykobakterie mají oproti jiným bakteriím málo propustnou buněčnou stěnu a pomalu se dělí. Základními antituberkulotiky jsou isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. (11) Proti mimoplicní formě tuberkulózy je lékem první volby též streptomycin. (12) V prvních dvou měsících léčení se podávají všechna čtyři základní antituberkulotika, další čtyři měsíce se podávají pouze dvě antituberkulotika, nejčastěji isoniazid a rifampicin, případně

jiná podle citlivosti. (11) Antituberkulotika se používají výhradně v kombinaci kvůli vysoké pravděpodobnosti vzniku rezistence, pouze isoniazid se podává samostatně u profylaktického podání. (13)

2.3.1 Isoniazid

Isoniazid (strukturní vzorec viz obrázek 1) působí selektivně na *Mycobacterium tuberculosis*, působí baktericidně, na neaktivní stádia působí bakteriostaticky. Isoniazid je proléčivo, které se díky činnosti mykobakteriálního enzymu katalázy-peroxidázy (KatG) přeměňuje na reaktivní sloučeninu. Ta vytvoří komplex s nikotinamidadenindinukleotidem (NAD^+), který inhibuje NADH-dependentní enoyl-ACP (acyl carrier protein) reduktázu, což zabraňuje prodlužování řetězce mykolových kyselin; toto je považováno za primární a hlavní mechanismus účinku. Při aktivaci isoniazidu ale též vznikají různé kyslíkové radikály, které narušují syntézu deoxyribonukleové kyseliny (DNA), lipidů, sacharidů a NAD^+ . (14)

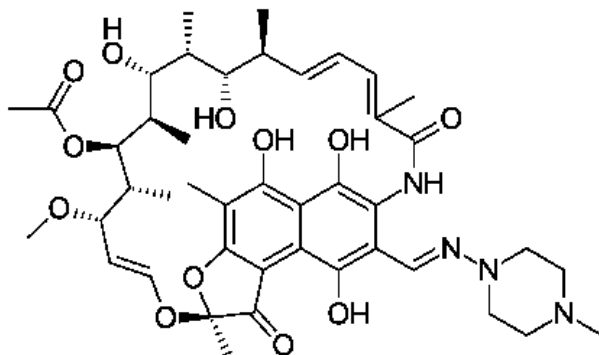
Isoniazid je metabolizován primárně játry, kde je acetylován *N*-acetyltransferázou na *N*-acetylisoniazid. Rychlost acetylace je dána geneticky. Poté se *N*-acetylisoniazid hydrolyzuje na kyselinu isonikotinovou, hydrazin a acetát. *N*-Acetylisoniazid může být také hydrolyzován za vzniku kyseliny isonikotinové a acetylhydrazinu. Hydrazin může být acetylován na acetylhydrazin a diacetylhydrazin. Předpokládá se, že hydrazin a acetylhydrazin jsou dále oxidovány na reaktivní metabolity, které jsou hepatotoxické. (15) Hepatotoxicita je jednou z hlavních nevýhod isoniazidu.



Obrázek 1: Strukturní vzorec isoniazidu

2.3.2 Rifampicin

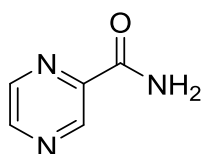
Rifampicin (strukturní vzorec viz obrázek 2) je baktericidní ansamycinové antibiotikum, jehož mechanismus účinku je blokáce DNA-dependentní polymerázy ribonukleových kyselin bakterií. (16) Kromě léčby tuberkulózy, atypických mykobakterií a lepy se používá také například při léčbě stafylokokových infekcí. (17)



Obrázek 2: Strukturní vzorec rifampicinu

2.3.3 Pyrazinamid

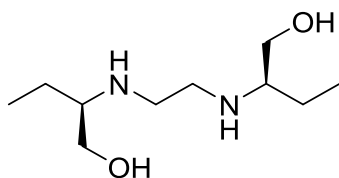
Pyrazinamid (strukturní vzorec viz obrázek 3) působí selektivně na *Mycobacterium tuberculosis* a je aktivní pouze při kyselém pH. Vstupuje do bakterie pasivně a je metabolizován enzymem pyrazinamidázou v cytoplazmě na kyselinu pyrazinovou, která je aktivní formou léčiva. (18) Kyselina pyrazinová přerušuje biosyntézu koenzymu A u *Mycobacterium tuberculosis* vazbou na aspartát dekarboxylázu tím, že spouští její degradaci. (19).



Obrázek 3: Strukturní vzorec pyrazinamidu

2.3.4 Ethambutol

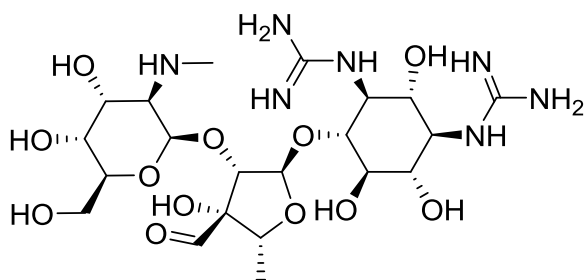
Ethambutol (strukturní vzorec viz obrázek 4) je bakteriostatické léčivo, jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici arabinosyl transferázy, a tím brání vzniku arabinogalaktanu, což má za následek poruchu tvorby buněčné stěny. (20) Je považován za primárně bakteriostatický, ale v kombinaci zvyšuje baktericidní potenciál a oddaluje vznik rezistence.



Obrázek 4 Strukturní vzorec ethambutolu

2.3.5 Streptomycin

Streptomycin (strukturální vzorec viz obrázek 5) je aminoglykosid, inhibuje syntézu bílkovin tak, že se ireverzibilně váže na 30S podjednotku ribozomu. (21)



Obrázek 5: Strukturní vzorec streptomycinu

2.4 Strategie léčby rezistentní tuberkulózy

Léčba rezistentní tuberkulózy je náročnější, protože je potřeba zjistit citlivost i na antituberkulotika druhé linie a sestavit individuální režim léčení. Antituberkulotika druhé linie mají nižší účinnost než ta z první, proto se také prodlužuje i doba léčení, trvá od devíti do dvaceti čtyř měsíců. (11) Multirezistentní TBC (MDR-TB) znamená, že je původce rezistentní na dvě základní antituberkulotika, a to na rifampicin a isoniazid. (3) Extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB) je kmen navíc rezistentní vůči kterémukoliv fluorochinolonu a vůči alespoň jednomu injekčně podávanému léčivu z druhé linie – amikacinu, kapreomycinu a kanamycinu. (22)

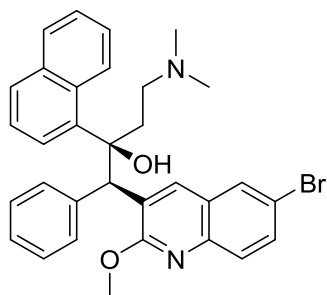
Skupina A – fluorochinolony	Skupina B – léčiva druhé linie podávaná injekčně	Skupina C – ostatní léčiva druhé linie
Levofloxacin	Amikacin	Ethionamid/prothionamid
Moxifloxacin	Kapreomycin	Cykloserin/terizidon
Gatifloxacin	Kanamycin	Linezolid
	(Streptomycin)	Klofazimin
Skupina D – přídatná léčiva (nejsou základní pro léčbu MDR-TB)		
D1	D2	D3
Pyrazinamid	Bedachilin	<i>p</i> -Aminosalicylová kyselina
Ethambutol	Delamanid	Imipenem-cilastatin
Vysoké dávky isoniazidu		Meropenem
		Amoxicillin-klavulanát
		(Thioacetazon)

Tabulka 1: Tabulka WHO 2016 klasifikace léčiv používaných proti MDR-TB (23)

Podle klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2016 (viz tabulka 1) je v případě MDR-TB potřeba během intenzivní fáze použít alespoň pět účinných léčiv proti TBC. V tomto případě se používá pyrazinamid a čtyři léčiva druhé linie (viz tabulka WHO): jedno ze skupiny A, jedno ze skupiny B a dvě ze skupiny C. Pokud to takto sestavit nelze, přidává se léčivo ze skupiny D2 a další léčivé látky ze skupiny D3. Pokud nelze použít pyrazinamid, je možné ho nahradit léčivem ze skupiny C nebo D. Další léčivé látky ze skupiny D1 se přidávají pouze v případě, že by měly být prokazatelným přínosem (24) – například vysoké dávky isoniazidu v případě pacienta bez rezistence na vysoké dávky isoniazidu. (25)

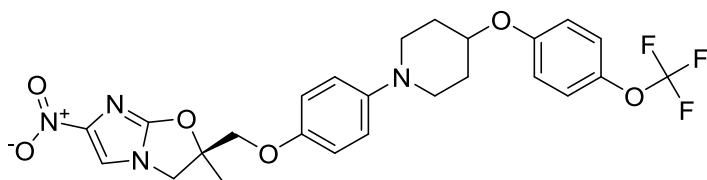
2.4.1 Nová antituberkulotika

V nedávné době byla vyvinuta a do klinické praxe zavedena dvě nová léčiva na multirezistentní tuberkulózu. Cena těchto léčiv je velmi vysoká, takže použití v praxi není běžné. (3) Bedachilin (strukturní vzorec viz obrázek 6) byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v roce 2012 a jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici mykobakteriální ATP (adenosintrifosfát) syntázy, na kterou se váže a brání v rotaci jedné z jejích podjednotek. Zároveň vykazuje „uncoupling“ vlastnosti, tj. ovlivňuje transport elektronů a rozpojuje tak oxidativní fosforylaci. (26)



Obrázek 6: Strukturální vzorec bedachilinu

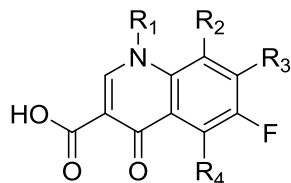
Dalším léčivem je delamanid (strukturální vzorec viz obrázek 7), který byl Evropskou lékovou agenturou schválen v roce 2013. Je to proléčivo, které potřebuje aktivaci mykobakteriálním enzymem. Jeho mechanismus účinku spočívá primárně v inhibici syntézy mykolových kyselin. (27)



Obrázek 7: Struktura delamanidu

2.4.2 Fluorochinolony

Fluorochinolony (obecná struktura na obrázku 8) hrají důležitou roli v léčbě MDR-TB, konkrétně se používají levofloxacin, moxifloxacin a gatifloxacin. (23) Tato třída antibiotik inhibuje DNA gyrázu a topoizomerázu IV a tak brání syntéze bakteriální DNA. (28)



Obrázek 8: Obecná struktura fluorochinolonů

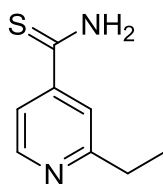
2.4.3 Injekční léčiva druhé linie (aminoglykosidy)

Aminoglykosidy amikacin, kanamycin a streptomycin se využívají v léčbě MDR-TB. Ireverzibilně se vážou na 30S podjednotku ribozomu a tím inhibují syntézu bílkovin. (29) Dále se do injekčních léčiv druhé linie řadí také polypeptid kapreomycin, který také blokuje proteosyntézu. (30)

2.4.4 Ostatní léčiva druhé linie

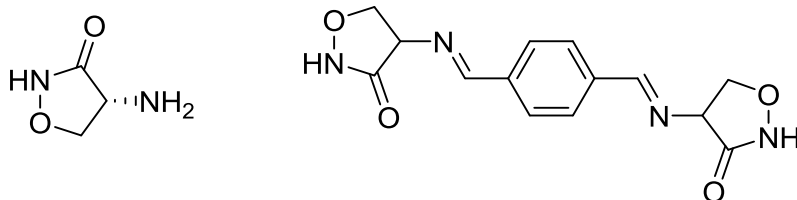
Do ostatních léčiv druhé linie patří ethionamid/prothionamid, cykloserin/terizidon, linezolid a klofazimin.

Ethionamid (struktura na obrázku 9) a prothionamid (oproti ethionamidu má místo ethylu navázaný propyl) jsou strukturně podobné isoniazidu, také blokuje syntézu mykologických kyselin a brání tak syntéze buněčné stěny. Zkřížená rezistence s isoniazidem je ale vzácná. (31)



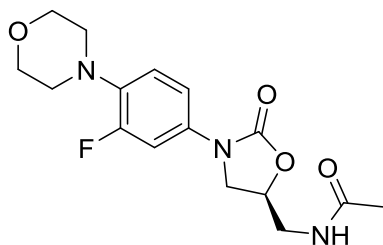
Obrázek 9: Struktura ethionamidu

Cykloserin a jeho kondenzát s tereftalaldehydem terizidon (struktura cykloserinu na obrázku 10 vlevo a struktura terizidonu vpravo) blokuje L-alanin racemátu a D-alanin ligázu, čímž zabráňují syntéze peptidoglykanu, a tím inhibují růst buněčné stěny. (32)



Obrázek 10: Struktura cykloserinu a terizidonu

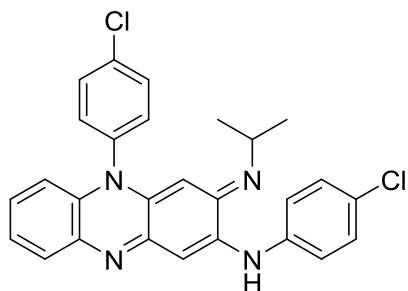
Linezolid (strukturní vzorec na obrázku 11) patří do skupiny oxazolidinonů. Váže se na 23S místo 50S podjednotky ribozomální ribonukleové kyseliny. Tímto blokuje iniciaci proteosyntézy a brání tak v konečném důsledku bakteriím v dělení. (33)



Obrázek 11: Struktura linezolidu

Klofazimin (strukturní vzorec na obrázku 12) interaguje s bakteriálními membránovými fosfolipidy, což ovlivňuje příjem draslíkových kationtů a produkci ATP.

Tvoří také reaktivní formy kyslíku a vazbou na guanin v DNA blokuje dělení buněk. (34)
(35)



Obrázek 12: Struktura klofaziminu

2.5 Bakteriální rezistence

Bakteriální rezistence je obecně schopnost bakterií přežít v přítomnosti konkrétního antibiotika. Rezistence bakterií na antibiotika se pořád rozšiřuje, což představuje závažný problém pro léčbu bakteriálních infekcí. (36) Porozumění mechanismům bakteriální rezistence má zásadní význam při navrhování inovativní terapeutické strategie a vymýšlení nových struktur léčiv.

Rezistenci je možné rozdělit na vnitřní a získanou rezistenci. Vnitřní mechanismy rezistence umožňují bakterii obranu proti cytotoxicitě xenobiotik. (37) Vnitřní rezistence je vrozená odolnost bakterie vůči působení antibiotika díky specifické vlastnosti nebo schopnosti. (38) Získaná rezistence může vzniknout u bakterií původně citlivých na určité antibiotikum z důvodu mutací genu na bakteriálním chromozomu nebo získáním genu od nějaké jiné bakterie. (39)

2.5.1 Rezistence na antituberkulotika

Rezistentní tuberkulóza je velký problém, ročně se na světě objeví téměř jeden a půl miliónu případů tuberkulózy rezistentních na rifampicin, z čehož je 78 % multirezistentních. V roce 2019 bylo 3,3 % nových případů a 17,7 % dříve diagnostikovaných případů multirezistentních. (1) Rezistentní bakterie vznikají kvůli dlouhodobému vystavování léčivé látky a noncompliance pacienta k léčbě. Nízká, subletální koncentrace léčiva je hlavní příčinou vzniku mutací.

Rozlišuje se monorezistence a polyrezistence. Monorezistencí se rozumí necitlivost *Mtb.* pouze na jedno základní antituberkulotikum. Polyrezistentní kmen je *in vitro*

rezistentní na více než jedno antituberkulotikum první řady, ale nejde o současnou rezistenci k isoniazidu a rifampicinu (to je MDR-TB). (40)

Ke vzniku rezistence dochází buď fenotypicky, nebo změnou genomu. U mykobakterií se objevují mutace především v důsledku mutací v chromozomu, v genu kódujícím cíl léčiva nebo v enzimech aktivující léčivou látku. (41) Důsledek těchto změn může být:

- 1) *Nepropustnost buněčné stěny.* Obal mykobakterie se skládá ze tří vrstev – obal, buněčná stěna a buněčná membrána. (42) Vnější obal je převážně tvořen bílkovinami, glukany a malým množstvím lipidů. Buněčná stěna se skládá z mykolových kyselin, arabinogalaktanu a peptidoglykanu, které dohromady s dalšími lipidy a buněčnou membránou tvoří hydrofobní vrstvu. Díky lipidům je obal mykobakterie velmi silný a hydrofobní, což brání v difuzi i hydrofobním molekulám. Ovlivnění tekutosti membrány je jeden ze způsobů zvýšení účinnosti antituberkulotik. (43) Ztluštěním buněčné stěny vzniká rezistence na rifamyciny, makrolidy, fluorochinolony a tetracykliny. (44)
- 2) *Eflux léčiva* způsobují proteiny zvané efluxní pumpy, které tvoří aktivní mechanismus rezistence a za spotřeby energie vylučují léčivo z buňky. Takto může vzniknout rezistence k fluorochinolonům, tetracyklinům a aminoglykosidům. (42)
- 3) *Rozklad a modifikace léčiva.* Mykobakterie produkují enzymy, které jsou schopny inaktivovat léčivo. Různé enzymy dokážou inaktivovat aminoglykosidy, β -laktamy a makrolidy. (44)
- 4) *Změna cílového místa* může zabránit vazbě antibiotika na cílové místo. Tímto způsobem mohou být mykobakterie rezistentní vůči linkosamidům, makrolidům a streptomycinu. (45)
- 5) *Vytváření falešných cílů.* Bakterie tvoří místo podobné cíli antibiotika, například DNA gyráze, a tímto může být způsobena rezistence k fluorochinolonům, které jsou vyvázány těmito imitujícími molekulami. (46)

2.6 Modifikace isoniazidu

Jedním z přístupů k vývoji nových léčiv proti TBC je syntéza nových analog nebo modifikace již používaných léčiv. V ideálním případě by nová léčiva měla mít vyšší aktivitu, nižší toxicitu, měla by zkrátit dobu léčby, vyhnout se lékovým interakcím se současnými režimy a být aktivní proti MDR-TB a XDR-TB. (47)

Isoniazid představuje jedinečný lék proti TBC, díky jeho vysoké specifitě proti *Mtb*. Byla zjištěna lepší aktivita v případě zavedení lipofilní skupiny do struktury isoniazidu z důvodu vyšší permeace léčiva do buněk *Mtb*. (48) Zároveň je však možné modifikovat pouze hydrazinovou část molekuly, pyridin-4-ylkarbonylový fragment musí být pro vysokou aktivitu zachován. (49)

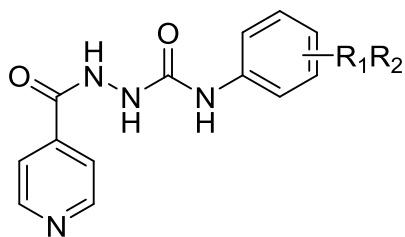
2.6.1 Hybridní sloučeniny isoniazidu

V poslední době je hybridizace více bioaktivních molekul do jedné společné entity jednou z často používaných metod. Kombinují se dvě a více různých účinných látek, jejichž spojením vznikne nová molekula. Farmakofory poté mohou působit na stejné či různé cíle nebo jedna část molekuly může vyvážit nežádoucí účinky té druhé. (48)

Nejúspěšnější sloučenina z této skupiny je hybrid INH a pyrrolu LL-3858 (Sudoterb), která se dostala až do klinických studií. Bylo vyvinuto mnoho hybridních molekul, které je možné rozdělit do skupin podle přítomných charakteristických funkčních skupin:

- **INH s různými aniliny spojené prostřednictvím karbonylové skupiny**

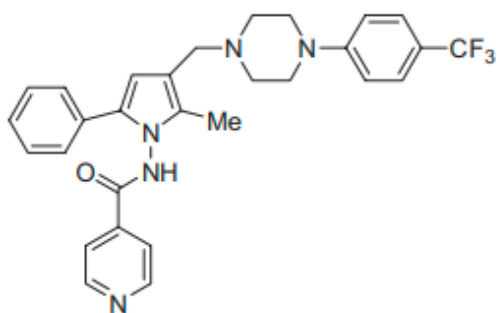
Obecná struktura sloučenin anilinů spojených s isoniazidem karbonylovým můstkem je na obrázku 13. Sloučeniny nemají proti *Mtb*. vyšší aktivitu než isoniazid. Sloučeniny se zavedeným alkylem měly vyšší aktivitu proti *M. avium* a *M. kansasii* oproti sloučeninám s halogenovaným fenylem. Cyklizací těchto sloučenin vznikají oxadiazoly, které však v případě halogenovaných anilinů postrádaly antimykobakteriální aktivitu. (50)



Obrázek 13: Obecná struktura sloučenin isoniazidu s různými aniliny spojené karbonylem

- **INH-pyrrolové hybridy**

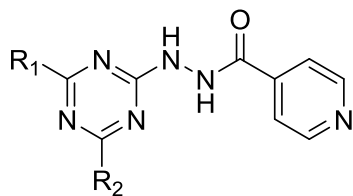
Pyrroly mají *in vitro* antimykobakteriální aktivitu. Sloučenina LL-3858 (strukturní vzorec viz obrázek 14) má velice dobrou aktivitu také proti MDR-TB. Její MIC je 0,025 až 0,12 μ g/ml proti *Mtb.*, postoupila do klinické fáze hodnocení. (51)



Obrázek 14: Struktura LL-3858 (51)

- **INH-triazinové hybridy**

Triazin (1,3,5-triazin) blokuje dihydrofolátreduktázu, což je také jeden z vedlejších cílů isoniazidu. Sloučeniny s obecným vzorcem na obrázku 15 vykazovaly nižší aktivitu proti plně citlivému kmeni *Mtb.* H₃₇Rv než isoniazid. (52)

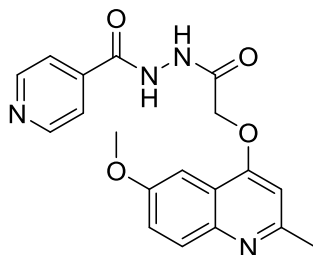


Obrázek 15: Strukturní vzorec triazinových hybridů

- **INH-chino(xa)linové hybridy**

Heterocykly chinolin a chinoxalin se nacházejí ve velkém množství přírodních produktů a mají různé biologické aktivity. Chinolin se nachází také ve fluorochinolonech, které se proti MDR-TB běžně používají. Chinolinové deriváty reagují s enzymem ATP

syntázou a tím blokuje hlavní zdroj energie pro bakterii. (53) Derivát chinolinu (struktura na obrázku 16) vykazoval mírnou aktivitu proti *Mtb.* současně s nulovou cytotoxicitou. (48)



Obrázek 16: *N'*-[2-[(6-Methoxy-2-methylchinolin-4-yl)oxy]acetyl]isonikotinohydrazid

- **Ostatní hybridy INH**

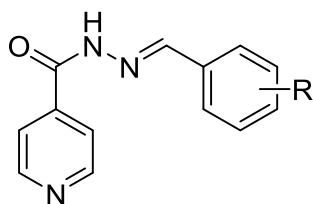
Existuje celá řada aktivních molekul, se kterými byly syntetizovány hybridy s INH, z nichž jsou některé zároveň hydrazid-hydrazony – např. pyrazolin, (54) kyselina skořicová, ketosteroidy, thiazolidindiony, isatin, glykosidy, diterpeny či terpenické kyseliny betulinová, oleanolová, ursolová a glycyrrhetová. (48) Mnohé z těchto sloučenin měly výhodnější vlastnosti než výchozí INH.

2.6.2 Deriváty na bázi hydrazid-hydrazonu isoniazidu

Hlavní metabolická cesta isoniazidu je acetylace pomocí *N*-acetyltransferázy. Proto je výhodná strategie modifikovat isoniazid funkční skupinou, která blokuje acetylaci a zároveň má vzniklý derivát stále vysokou antimykobakteriální aktivitu. Tyto sloučeniny jsou také v závislosti na typu substituentu většinou málo toxické. (55) V případě zavedení lipofilní skupiny se také zvýší permeace léčiva do buněk. Bylo navrženo několik typů hydrazid-hydrazonů isoniazidu:

- **hydrazony INH se substituovanými benzaldehydy**

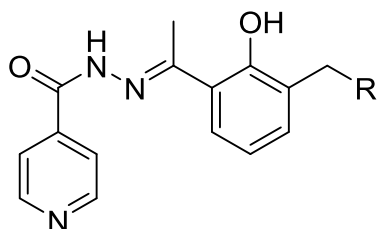
Jedna z nejčastěji využívaných možností je reakce INH s benzaldehydy (obecná struktura sloučeniny na obrázku 17). MIC těchto sloučenin byla srovnatelná s isoniazidem, na který se metabolizují. (56)



Obrázek 17: Obecná struktura sloučenin vzniklých reakcí substituovaných benzaldehydů s INH

- **hydrazony INH s 3-substituovanými 2-hydroxyacetofenony**

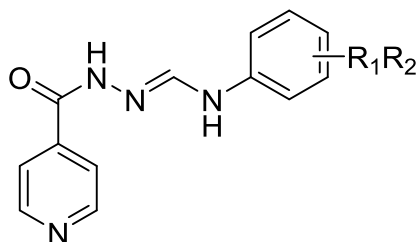
Byly připraveny také sloučeniny s isoniazidu s 3-substituovanými 2-hydroxyacetofenony (obecná struktura na obrázku 18). Nejúspěšnější derivát (R = piperazin-1-yl, který může být dále substituován na dusíku v poloze 4) byl *in vitro* čtyřikrát účinnější než isoniazid. (57)



Obrázek 18: Obecný vzorec sloučenin isoniazidu s 3-substituovanými 2-hydroxyacetofenony

- **INH spojený s aniliny methinovým můstkem**

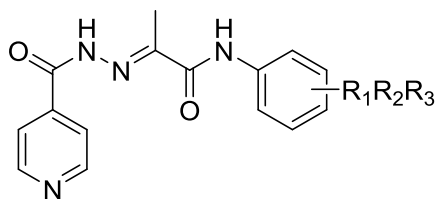
Většina derivátů INH s aniliny spojených -CH= fragmentem (methinovým můstkem; obecná struktura na obrázku 18) vykazovala podobnou aktivitu proti *Mtb.* jako isoniazid, ale měla navíc lepší aktivitu proti *M. kansasii.* (58)



Obrázek 19: Obecný vzorec sloučenin isoniazidu s anilinem spojených CH fragmentem

- **INH s různými aniliny spojené prostřednictvím kyseliny pyrohroznové**

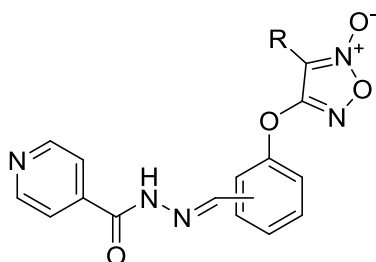
Sloučeniny isoniazidu s různě substituovanými aniliny propojené kyselinou pyrohroznovou (obecná struktura na obrázku 20) mají velice dobrou aktivitu proti *Mtb.* Jejich MIC se pohybuje od $\leq 0,03 \mu\text{M}$, aktivní jsou také proti *M. kansasii* a o něco méně i vůči MDR-TB a XDR-TB kmenům. Sloučeniny nevykazovaly žádnou cytotoxickou ani cytostatickou aktivitu proti buňkám HepG2. (60)



Obrázek 20: Obecná struktura sloučenin INH s různě substituovanými aniliny spojené kyselinou pyrohroznovou

- **INH-furoxanové hybridy**

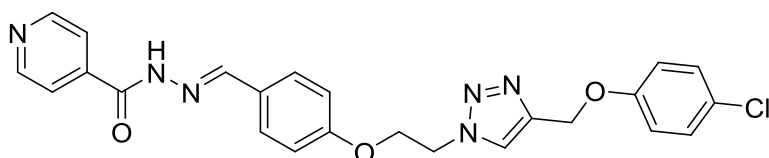
Deriváty furoxanu (obecný vzorec na obrázku 21) představují důležitou skupinu sloučenin s řadou biologických aktivit, které jsou spojeny s jeho schopností po biotransformaci generovat oxid dusnatý. Oxid dusnatý je nejen důležitý mediátor produkovaný makrofágy během infekce *Mtb.*, ale také může narušit syntézu bakteriální DNA, bílkovin, signálních mediátorů a způsobuje oxidační stres. (59)



Obrázek 21: Obecná struktura furoxanových hybridů

- **INH-azolové hybridy**

Triazoly jsou jedny z nejvýznamnějších heterocyklů, které vykazují antimykobakteriální aktivitu. Azoly působí podobným mechanismem proti TBC jako INH – blokují syntézu lipidů a tím inhibují syntézu buněčné stěny. (61) Nejlepší sloučenina (strukturní vzorec na obrázku 22) vykazovala lepší aktivitu *in vitro* než isoniazid a byla zkoumána také *in vivo*, kde bohužel prokázala aktivitu pouze mírnou. (62)

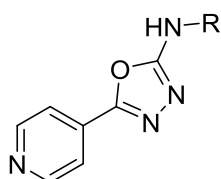


Obrázek 22: Struktura triazolového hybridu s nejlepší *in vitro* aktivitou

2.6.3 Oxadiazoly odvozené od isoniazidu

- **N-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy**

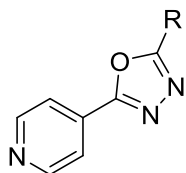
Série *N*-alkyl-2-isonikotinoylhydrazin-1-karboxamidů byla syntetizována z isoniazidu a isokyanátů a poté byly sloučeniny cyklizovány na *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminy (obecná struktura na obrázku 23). Mechanismus účinku není jasný, ale liší se od mechanismu účinku isoniazidu a neobjevuje se zkřížená rezistence s isoniazidem. Jsou tak účinné i na MDR-TB a XDR-TB kmeny. (63)



Obrázek 23: Obecná struktura *N*-alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů

- **4-(5-substituované-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridiny**

Alkylové deriváty 4-(5-substituované-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridiny (obecná struktura na obrázku 24). Sloučeniny vykazovaly dobrou aktivitu proti *Mtb.* a také rezistentním kmenům. Nejlepší aktivitu vykazovaly sloučeniny s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. (64)



Obrázek 24: 4-(5-substituované-1,3,4-oxadiazoly-2-yl)pyridiny

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce je příprava, charakterizace a hodnocení antimykobakteriální aktivity potenciálních antituberkulotik odvozených od isoniazidu na bázi jeho hydrazid-hydrazonů. Hlavní metabolická cesta isoniazidu je acetylace pomocí *N*-acetyltransferázy, (55) proto je vhodné modifikovat strukturu isoniazidu funkční skupinou, která acetylaci blokuje. Zároveň je výhodné zvýšit lipofilitu sloučenin, aby lépe pronikaly přes vysoce lipofilní mykobakteriální buněčnou stěnu a obecně také biologickými membránami. (48)

Jako sloučenina pro tvorbu hydrazonu je zvolena bifunkční kyselina glyoxalová, která je málo toxická a běžně se vyskytuje v glyoxylátovém cyklu. Glyoxylátový cyklus je anabolická reakce vyskytující se v rostlinách, bakteriích, prvocích a houbách. Vede k přeměně acetylu-CoA na sukcinát pro syntézu sacharidů. (65)

Ve výchozí práci (60) byla použita kyselina pyrohroznová. Místo ní je v této práci použita kyselina glyoxalová, která reaguje s isoniazidem za vzniku 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny (INHA). Diplomová práce se zabývá tvorbou amidů této kyseliny s různě substituovanými aniliny. Aniliny spojené různými můstky s isoniazidem mají dobrou aktivitu proti mykobakteriím. (50) (58) (60)

Tato práce je součástí současně připravované série za účelem zejména zvýšení aktivity výchozího INH.

4 Experimentální část

4.1 Chemická část

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

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána soustava dichlormethan/methanol 40:3 (v/v), případně 4:1 (v/v), detekce byla prováděna ultrafialovou lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

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

Infračervená spektra (IR) byla změřena technikou ATR (Attenuated Total Reflectance) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650–4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc., a Mgr. Janou Maříkovou, Ph.D. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístroji Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6), *N,N*-dimethylformamid (DMF- d_7) a tetrahydrofuran (THF- d_8). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) v protonových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla. Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko).

Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Vario MICRO Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

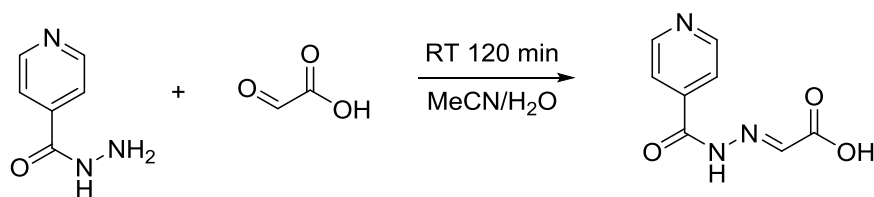
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 20.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, MA, USA). V tomto programu byly také vypočteny hodnoty $\log P$ připravených sloučenin, tj. hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu oktan-1-ol/voda.

4.1.1 Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny (66)

Kyselina 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octová byla připravena podle schématu na obrázku 25. Postup přípravy: 10 mmol (1,37 g) isoniazidu bylo rozpuštěno ve směsi acetonitrilu a demineralizované vody (1:4, v/v). Do roztoku byl za stálého míchání přidán roztok monohydrátu kyseliny glyoxalové v demineralizované vodě 1,1 ekv./2 ml vody (1,013 g monohydrátu kyseliny glyoxalové). Po 120 minutách byl vzniklý precipitát odfiltrován na nuči za sníženého tlaku, promyt malým množstvím vody, poté malým množstvím methanolu. Produkt byl poté vysušen.

Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (vyvíjecí soustava dichlormethan/methanol 4:1, v/v) v čase 0 (samotný INH), 0' (ihned po přidání kyseliny glyoxalové), 5, 15, 60 a 120 minut. Všechny tyto nanášky byly naneseny na jednu TLC desku, která byla vyvolána najednou po 120 minutách.



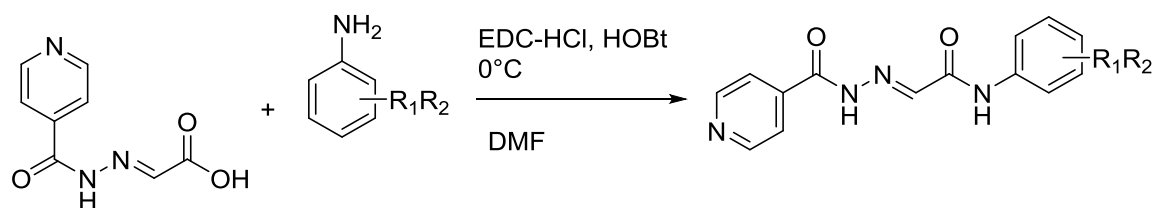
Obrázek 25: Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny

Sumární vzorec:	C ₈ H ₇ N ₃ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	193,16
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	97 %
Teplota tání:	204,5 °C
R _f :	0,322

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.40 (1H, s, CONHN), 8.80 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, H2, H6), 7.80 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, H3, H5), 7.75 (1H, s, N=CH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 164.66, 162.71, 150.65, 140.27, 139.87, 121.80.

4.1.2 Příprava *N*-fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů



Obrázek 26: Schéma přípravy *N*-fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů

Kód	R ₁ R ₂	Kód	R ₁ R ₂
1	3-fluor	9	3,5-dimethyl
2	3-jod	10	4-ethyl
3	3,4-difluor	11	4-propyl
4	3-trifluormethyl	12	4-butyl
5	3-trifluormethoxy	13	4- <i>terc</i> -butyl
6	3-nitro	14	3-pentyl
7	3-methyl (66)	15	4-decyl
8	3,4-dimethyl	16	4-dodecyl

Tabulka 2: Substituenty použité při syntézách a přiřazené kódy

N-Fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidy byly připraveny podle reakčního schématu na obrázku 26 a byly použity aniliny vyjmenované v tabulce 2. Postup přípravy: 0,001 mol 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny (193 mg) bylo rozpuštěno v 15 ml *N,N*-dimethylformamidu (DMF) společně s 1,1 ekvivalentem HOBt (1-hydroxybenzotriazol hydrát, 149 mg) a 1,1 ekvivalentem příslušného *R*-anilinu (viz tabulka 2). Reakční směs byla ochlazená ledem na nejvýše 0 °C a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,3 ekvivalentu (0,0013 mol) EDC.HCl (*N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid, 0,249 g). Reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání a téhož chlazení 4 hodiny, následně minimálně 12 hodin za laboratorní teploty. Reakční směs byla odpařena na rotační vakuové odparce do sucha/vzniku viskózní nažloutlé olejové hmoty. Surový produkt byl přenesen pomocí 20 ml ethyl-acetátu (nebo dichlormethanu) a následně 20 ml vody do dělicí nálevky, kde byla organická vrstva extrahována nejprve 5% NaHCO₃ a posléze nasycenou solankou

(touto procedurou došlo k odstranění nezreagované kyseliny, HOBt, EDC.HCl a vedlejšího produktu – močoviny vzniklé reakcí z EDC.HCl). Organická vrstva byla vysušena stáním nad bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Precipitace krystalů byla indukována jednak dostatečným zahuštěním, případně přidavkem hexanu. Po min. 8 hodinách stání při +4 °C byly vyloučené krystaly odfiltrovány a vysušeny prosáváním vzduchem. V případě potřeby (znečištění výchozími látkami) byly vzniklé sloučeniny purifikovány rekrystalizací.

Reakce byla průběžně monitorována pomocí TLC (vyvíjecí soustava dichlormethan/methanol 4:0,3) v čase 0 (kyselina + HOBt + anilin), 0' (ihned po přidání EDC.HCl), 5, 15, 60 a 120 minut. Všechny tyto nanášky byly naneseny na jednu TLC desku, která byla vyvolána najednou po 120 minutách.

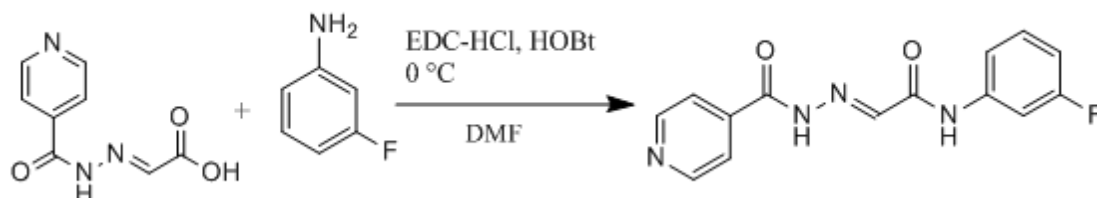
Připravené látky byly charakterizovány pomocí NMR, IR spekter, teploty tání a hodnot retenčního faktoru (R_f).

Schémata přípravy jednotlivých sloučenin jsou uvedena na obrázcích číslo 27 až 42.

4.1.2.1 (E)-N-(3-Fluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3-fluoranilin 106 μ l



Obrázek 27: Schéma přípravy (E)-N-(3-fluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₁ FN ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	286,27
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	63 %
Teplota tání:	202,9 °C
R _f :	0,322

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.47 (1H, s, CONHN), 10.58 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, J = 5.0 Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, J = 5.1 Hz, H3, H5), 7.72 (1H, d, J = 12.4 Hz, H2'), 7.54 (1H, d, J = 8.2 Hz, H6'), 7.37 (1H, q, J = 7.8 Hz, H4'), 6.93 (1H, td, J = 8.6, 2.6 Hz, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.76, 162.22 (d, J = 241.3 Hz), 161.53, 150.66, 142.84, 140.27 (d, J = 11.0 Hz), 139.97, 130.56 (d, J = 9.4 Hz), 121.81, 116.02, 110.65 (d, J = 21.0 Hz), 107.00 (d, J = 25.9 Hz).

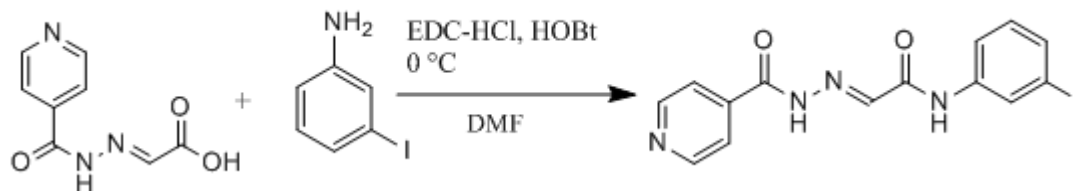
IR: 3523 (v(N-H)), 3193, 3119, 3072, 2845, 1682, 1657 (v(C=O) amid), 1607, 1552, 1489, 1446, 1414, 1331, 1320, 1286, 1265, 1255, 1223, 1164, 1068, 843, 751, 682, 614 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 58.74; H, 3.87; N, 19.57, nalezeno: C, 58.80; H, 3.83; N, 19.63.

4.1.2.2 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(3-jodfenyl)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3-jodanilin 132 μ l



Obrázek 28: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(3-jodfenyl)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₁ IN ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	394,17
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	80 %
Teplota tání:	145,0 °C
R _f :	0,097

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.46 (1H, s, CONHN), 10.48 (1H, s, CONH), 8.82 (2H, d, *J* = 4.9 Hz, H2, H6), 8.23 (1H, s, H2'), 7.94 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H3, H5), 7.75 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H4'), 7.47 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H6'), 7.15 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.73, 161.39, 150.65, 142.78, 139.96, 132.66, 132.60, 130.95, 128.36, 121.79, 119.46, 94.65.

IR: 3735, 3648, 3566, 3524 (ν (N-H)), 3502, 3446, 3177, 2841, 1657 (ν (C=O) amid), 1587, 1549, 1541, 1456, 1417, 1329, 1318, 1287, 1167, 1251, 783, 681, 654, 646 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 42.66; H, 2.81; N, 14.21, nalezeno: C, 42.54; H, 2.90; N, 14.09.

4.1.2.3 (E)-N-(3,4-Difluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3,4-difluoranilin

109 μ l



Obrázek 29: Schéma přípravy (E)-N-(3,4-difluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₀ F ₂ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	304,26
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	38 %
Teplota tání:	198,6-198,8 °C
R _f :	0,129

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.54 (1H, s, CONHN), 10.64 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H2, H6), 7.98 (1H, s, N=CH), 7.94-7.88 (1H, m, H2'), 7.84 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 7.58-7.53 (1H, m, H6'), 7.45-7.37 (1H, m, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.75, 161.50, 150.64, 149.02 (dd, $J = 243.2, 13.3$ Hz), 145.87 (dd, $J = 242.5, 12.5$ Hz), 142.75, 139.93, 135.61 (d, $J = 8.4$ Hz), 121.83, 117.59 (d, $J = 17.9$ Hz), 116.70 (d, $J = 5.0$ Hz), 109.31 (d, $J = 20.7$ Hz).

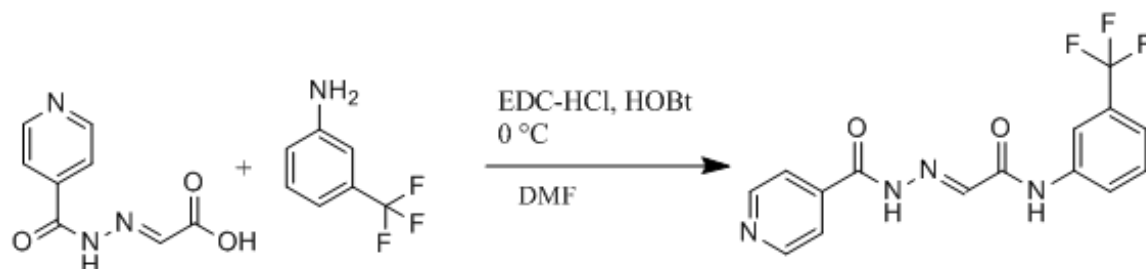
IR: 3629, 3609, 3508 (ν (N-H)), 3155, 2381, 2319, 1701, 1655 (ν (C=O) amid), 1560, 1512, 1319, 1282, 1249, 1091, 927, 843, 819, 751, 681, 660, 639, 614 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 55.27; H, 3.31; N, 18.41, nalezeno: C, 55.21; H, 3.25; N, 18.50.

4.1.2.4 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethyl)fenyl]acetamid

Navázka výchozí sloučeniny:

3-(trifluormethyl)anilin 137 μ l



Obrázek 30: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethyl)fenyl]acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₅ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	336,27
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	56 %
Teplota tání:	177,8-178,2 °C
R _f :	0,143

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.52 (1H, s, CONHN), 10.74 (1H, s, CONH), 8.82 (2H, d, J = 4.9 Hz, H2, H6), 8.22 (1H, s, H2'), 8.02 (1H, d, J = 8.3 Hz, H6'), 7.97 (1H, s, N=CH), 7.84 (2H, d, J = 4.9 Hz, H3, H5), 7.59 (1H, t, J = 8.0 Hz, H5'), 7.45 (1H, d, J = 7.8 Hz, H4').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.81, 161.78, 150.68, 142.70, 139.93, 139.36, 130.17, 129.63 (q, J = 31.6 Hz), 124.27 (q, J = 272.3 Hz), 123.83, 121.83, 120.46 (d, J = 4.1 Hz), 116.40.

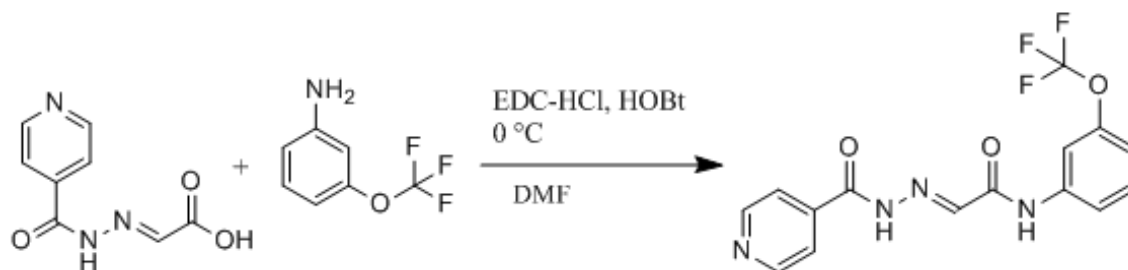
IR: 3511 (v(N-H)), 3158, 2852, 1658 (v(C=O) amid), 1603, 1564, 1551, 1450, 1341, 1331, 1318, 1258, 1226, 1167, 1121, 1095, 1067, 923, 891, 844, 811, 708, 698, 692, 666 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 53.58; H, 3.30; N, 16.66, nalezeno: C, 53.62; H, 3.30; N, 16.73.

4.1.2.5 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethoxy)fenyl]acetamidu

Navážka výchozí sloučeniny:

3-(trifluormethoxy)anilin 147 μ l



Obrázek 31: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-[3-(trifluormethoxy)fenyl]acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₅ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₃
Relativní molekulová hmotnost:	352,27
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	68 %
Teplota tání:	193,6 °C
R _f :	0,154

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.50 (1H, s, CONHN), 10.69 (1H, s, CONH), 8.82 (2H, d, J = 5.0 Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.90 (1H, s, H2'), 7.84 (2H, d, J = 5.0 Hz, H3, H5), 7.75 (1H, d, J = 8.4 Hz, H6'), 7.47 (1H, t, J = 8.2 Hz, H5'), 7.09 (1H, d, J = 8.1 Hz, H4').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.82, 161.70, 150.68, 148.62, 142.74, 140.24, 139.94, 130.67, 121.83, 120.29 (q, J = 256.3 Hz), 118.87, 116.19, 112.34.

IR: 3521 (v(N-H)), 3183, 2856, 1658 (v(C=O) amid), 1605, 1550, 1331, 1318, 1292, 1251, 1223, 1213, 1167, 1095, 927, 843, 707, 696, 688, 681, 636 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 51.14; H, 3.15; N, 15.90, nalezeno: C, 51.19; H, 3.21; N, 15.84.

4.1.2.6 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(3-nitrofenyl)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3-nitroanilin 152 mg



Obrázek 32: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(3-nitrofenyl)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₄
Relativní molekulová hmotnost:	313,27
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	61 %
Teplota tání:	129,6 °C
R _f :	0,169

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.42 (1H, s, CONHN), 10.90 (1H, s, CONH), 8.84-8.76 (3H, m, H2, H6, H2'), 8.15 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H6'), 7.98-7.94 (2H, m, N=CH, H4'), 7.84 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H3, H5), 7.64 (1H, t, *J* = 8.2 Hz, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.82, 161.95, 150.69, 148.11, 142.53, 139.91, 139.74, 130.36, 126.28, 121.82, 118.64, 114.46.

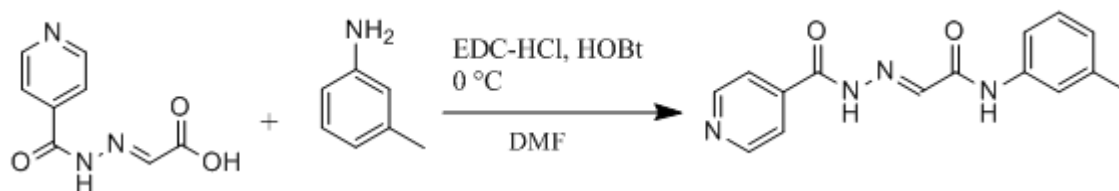
IR: 3302 (ν(N-H)), 3124, 1659 (ν(C=O) amid), 1605, 1549, 1523, 1344, 1332, 1315, 1285, 1260, 1165, 1093, 1070, 923, 891, 843, 816, 739, 708, 693, 670 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 53.68; H, 3.54; N, 22.36, nalezeno: C, 53.62; H, 3.51; N, 22.41.

4.1.2.7 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(m-tolyl)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3-methylanilin 119 μ l



Obrázek 33: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(m-tolyl)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	282,3
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	82 %
Teplota tání:	182,9 °C
R _f :	0,210

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.46 (1H, s, CONHN), 10.28 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H2, H6), 7.97 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 7.59-7.52 (2H, m, H2', H6'), 7.22 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H5'), 6.93 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H4'), 2.30 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.74, 161.07, 150.65, 143.16, 140.02, 138.45, 138.14, 128.78, 124.88, 121.81, 120.64, 117.35, 21.36.

IR: 3388 (ν (N-H)), 3255, 3197, 3030, 1683, 1655 (ν (C=O) amid), 1616, 1564, 1547, 1593, 1305, 1288, 1247, 1160, 918, 783, 690, 659, 648, 644, 631 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 63.82; H, 5.00; N, 19.85, nalezeno: C, 63.86; H, 5.04; N, 19.80.

4.1.2.8 (E)-N-(3,4-Dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3,4-dimethylanilin 133 mg



Obrázek 34: Schéma přípravy (E)-N-(3,4-dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	296,33
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	70 %
Teplota tání:	173,1 °C
R _f :	0,161

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.43 (1H, s, CONHN), 10.19 (1H, s, CONH), 8.82 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H2, H6), 7.94 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H3, H5), 7.52-7.41 (2H, m, H2', H6'), 7.09 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H5'), 2.20 (3H, s, CH₃), 2.18 (3H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.73, 160.86, 150.65, 143.25, 140.02, 136.55, 136.24, 132.03, 129.78, 121.80, 121.29, 117.69, 19.80, 19.01.

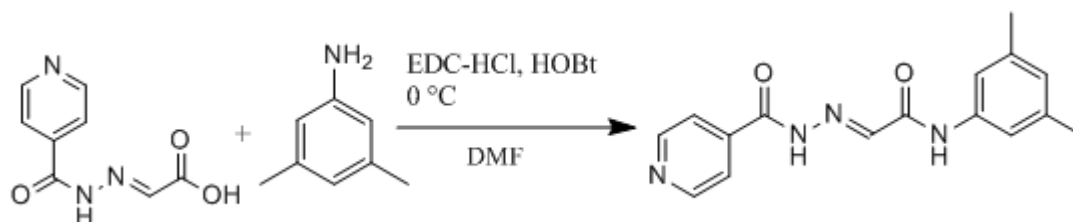
IR: 390 (ν(N-H)), 3251, 3033, 1680, 1653 (ν(C=O) amid), 1601, 1543, 1506, 1411, 1331, 1289, 1247, 1160, 1086, 935, 750, 692, 676, 646, 642 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 64.85; H, 5.44; N, 18.91, nalezeno: C, 64.82; H, 5.50; N, 18.88.

4.1.2.9 (E)-N-(3,5-Dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

3,5-dimethylanilin 133 mg



Obrázek 35: Schéma přípravy (E)-N-(3,5-dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	296,33
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	94 %
Teplota tání:	212,3-213,0 °C
R _f :	0,222

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.44 (1H, s, CONHN), 10.18 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, *J* = 5.1 Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, *J* = 5.0 Hz, H3, H5), 7.37 (2H, s, H2', H6'), 6.75 (1H, s, H4'), 2.25 (6H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.72, 160.95, 150.64, 143.17, 140.02, 138.36, 137.92, 125.71, 121.80, 117.84, 21.22.

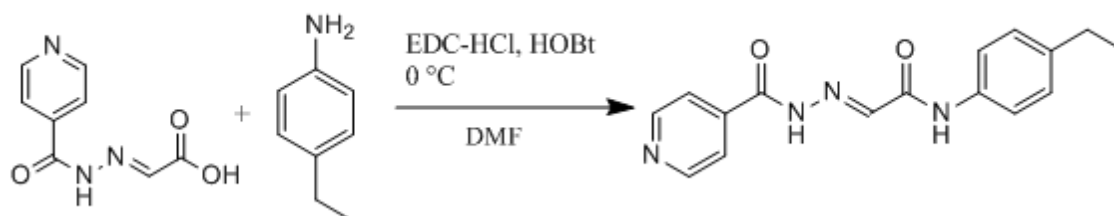
IR: 3271 (ν(N-H)), 3070, 2916, 1663 (ν(C=O) amid), 1621, 1606, 1573, 1547, 1475, 1322, 1304, 1281, 1254, 1241, 1163, 1157, 1065, 938, 883, 839, 791, 756, 701, 688, 666 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 64.85; H, 5.44; N, 18.91, nalezeno: C, 64.82; H, 5.50; N, 18.88.

4.1.2.10 (E)-N-(4-Ethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-ethylanilin 137 μ l



Obrázek 36: Schéma přípravy (E)-N-(4-ethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	296,33
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	83 %
Teplota tání:	177,4 °C
R _f :	0,243

¹H NMR (500 MHz, DMF-*d*₇): δ 12.49 (1H, s, CONHN), 10.67 (1H, s, CONH), 9.02 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H2, H6), 8.18 (1H, s, N=CH), 8.10 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 8.00 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H2', H6'), 7.40 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H3', H5'), 2.78 (2H, q, $J = 7.6$ Hz, CH₂), 1.37 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.40, 162.04, 151.34, 144.01, 140.70, 140.44, 137.23, 128.60, 122.24, 120.91, 28.59, 16.01.

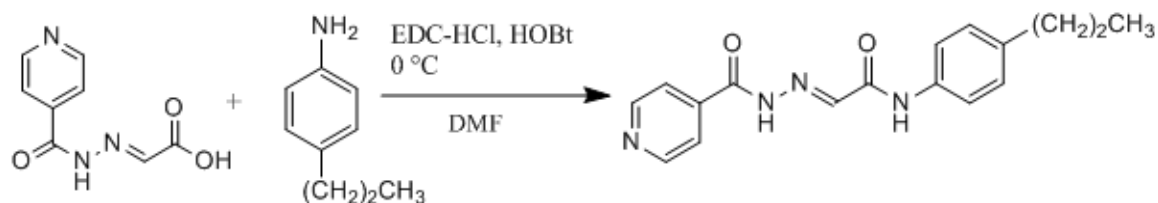
IR: 3242 (ν(N-H)), 1673 (ν(C=O) amid), 1600, 1541, 1515, 1414, 1285, 1010, 834, 755, 677, 659, 636, 613 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 64.85; H, 5.44; N, 18.91, nalezeno: C, 64.89; H, 5.40; N, 18.90.

4.1.2.11 (*E*)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-*N*-(4-propylfenyl)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-propylanilinu 162 μ l



Obrázek 37: Schéma přípravy (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-*N*-(4-propylfenyl)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	310,36
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	65 %
Teplota tání:	172,8 °C
R _f :	0,314

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.48 (1H, s, CONHN), 10.31 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H2, H6), 7.99 (1H, s, N=CH), 7.84 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 7.64 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H2', H6'), 7.15 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H3', H5'), 2.58 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, Ph-CH₂), 1.61-1.51 (2H, m, CH₂), 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.73, 160.95, 150.63, 143.24, 140.02, 138.00, 136.24, 128.70, 121.82, 120.16, 36.89, 24.27, 13.77.

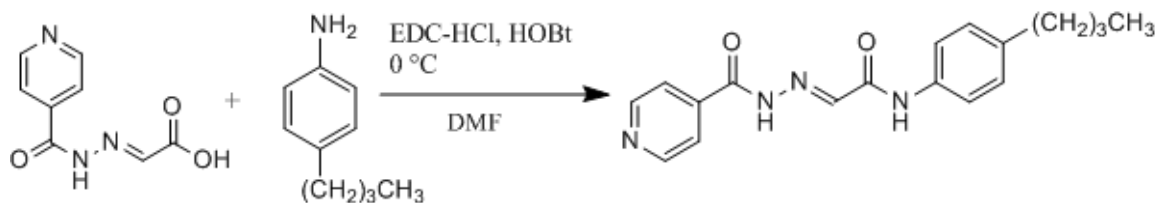
IR: 560, 3036, 2929 2855, 1702, 1654 (ν (C=O) amid), 1647, 1609, 1544, 1514, 1416, 1410, 1291, 1254, 1152, 1085, 832, 749, 672, 665 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 65.79; H, 5.85; N, 18.05, nalezeno: C, 65.71; H, 5.89; N, 18.10.

4.1.2.12 (E)-N-(4-Butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-butylanilin 174 μ l



Obrázek 38: Schéma přípravy (E)-N-(4-butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	324,16
Popis:	Světle žlutá krystalická látka
Výtěžek:	49 %
Teplota tání:	200,1-200,3 °C
R _f :	0,357

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.43 (1H, s, CONHN), 10.28 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 7.64 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H2', H6'), 7.15 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H3', H5'), 2.56 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, Ph-CH₂), 1.57-1.51 (2H, m, ²CH₂), 1.33-1.25 (2H, m, ³CH₂), 0.89 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.74, 160.93, 150.64, 143.24, 140.02, 138.20, 136.18, 128.64, 121.80, 120.19, 34.45, 33.34, 21.87, 13.95.

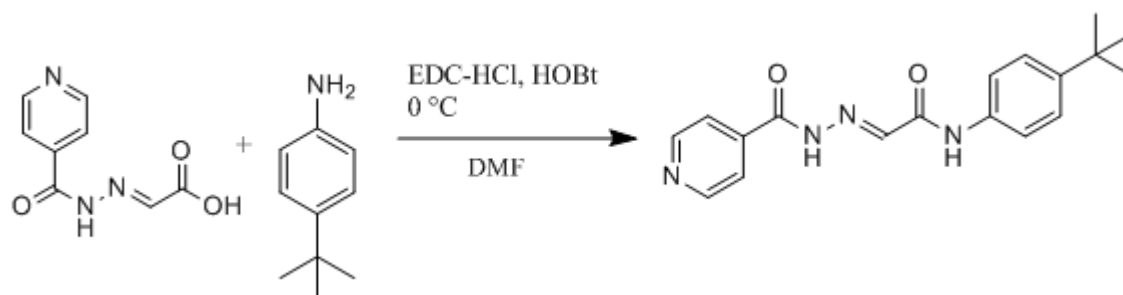
IR: 2962, 2925, 2858, 2370, 1676, 1654 (ν (C=O) amid), 1596, 1541, 1516, 1413, 1312, 1290, 1252, 1162, 929, 842, 831, 665, 647, 643, 639 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 66.65; H, 6.21; N, 17.27, nalezeno: C, 66.71; H, 6.24; N, 17.33.

4.1.2.13 (E)-N-[4-(Terc-butyl)fenyl]-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-*terc*-butylanilin 175 μ l



Obrázek 39: Schéma přípravy (E)-N-[4-(*terc*-butyl)fenyl]-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	324,38
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	72 %
Teplota tání:	182,8-183,2 °C
R _f :	0,292

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.49 (1H, s, CONHN), 10.29 (1H, s, CONH), 8.82 (2H, d, $J = 4.9$ Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, $J = 4.9$ Hz, H3, H5), 7.66 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H2', H6'), 7.36 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H3', H5'), 1.27 (9H, s, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.71, 160.97, 150.65, 146.55, 143.24, 140.04, 135.93, 125.54, 121.80, 119.97, 34.26, 31.34.

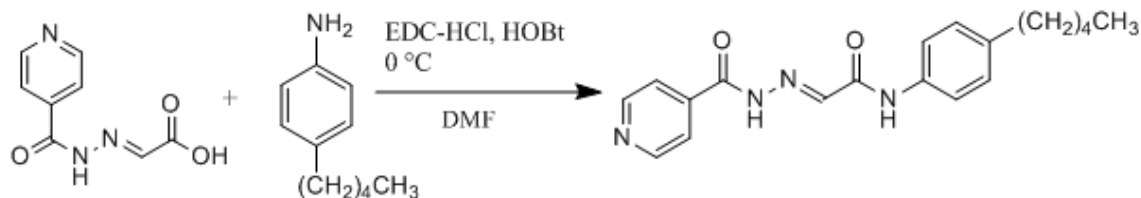
IR: 3566, 3524, 3213 (ν (N-H)), 2962, 1686, 1676 (ν (C=O) amid), 1648, 1600, 1542, 1533, 1406, 1296, 1086, 996, 936, 840, 827, 732, 697, 671 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 66.65; H, 6.21; N, 17.27, nalezeno: C, 66.69; H, 6.17; N, 17.33.

4.1.2.14 (E)-2-(2-Isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(4-pentylfenyl)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-pentylanilin 170 μ l



Obrázek 40: Schéma přípravy (E)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-N-(4-pentylfenyl)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	338,41
Popis:	Žlutá krystalická látka
Výtěžek:	59 %
Teplota tání:	177,0-177,2 °C
R _f :	0,257

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.50 (1H, s, CONHN), 10.30 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H2, H6), 8.00 (1H, s, N=CH), 7.85 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, H3, H5), 7.64 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H2', H6'), 7.15 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H3', H5'), 2.53 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, Ph-CH₂), 1.58-1.51 (2H, m, ²CH₂), 1.34-1.21 (4H, m, ³CH₂, ⁴CH₂), 0.85 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.69, 160.95, 150.63, 143.25, 140.01, 138.22, 136.21, 128.63, 121.83, 120.18, 34.74, 31.02, 30.84, 22.13, 14.09.

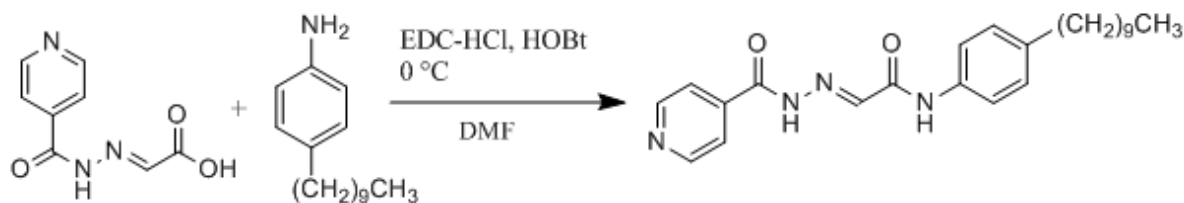
IR: 3243 (ν (N-H)), 3043, 2954, 2929, 2855, 1673 (ν (C=O) amid), 1598, 1556, 1527, 1412, 1369, 1281, 1250, 1149, 1080, 1012, 940, 843, 793, 753, 679, 659, 647 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 67.44; H, 6.55; N, 16.56, nalezeno: C, 67.40; H, 6.51; N, 16.62.

4.1.2.15 (*E*)-*N*-(4-Decylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-decylanilin 282 μ l



Obrázek 41: Schéma přípravy (*E*)-*N*-(4-decylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₂₄ H ₃₂ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	408,55
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	56 %
Teplota tání:	187,5-187,9 °C
R _f :	0,211

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.43 (1H, s, CONHN), 10.28 (1H, s, CONH), 8.81 (2H, d, J = 5.0 Hz, H2, H6), 7.95 (1H, s, N=CH), 7.83 (2H, d, J = 5.0 Hz, H3, H5), 7.63 (2H, d, J = 8.0 Hz, H2', H6'), 7.14 (2H, d, J = 8.1 Hz, H3', H5'), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, Ph-CH₂), 1.57-1.50 (2H, m, ²CH₂), 1.29-1.19 (14H, m, ³CH₂, ⁴CH₂, ⁵CH₂, ⁶CH₂, ⁷CH₂, ⁸CH₂, ⁹CH₂), 0.84 (3H, t, J = 6.8 Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 162.70, 160.92, 150.64, 143.23, 140.01, 138.21, 136.19, 128.62, 121.79, 120.15, 34.77, 31.46, 31.15, 29.18, 29.16, 29.03, 28.86, 28.77, 22.26, 14.12.

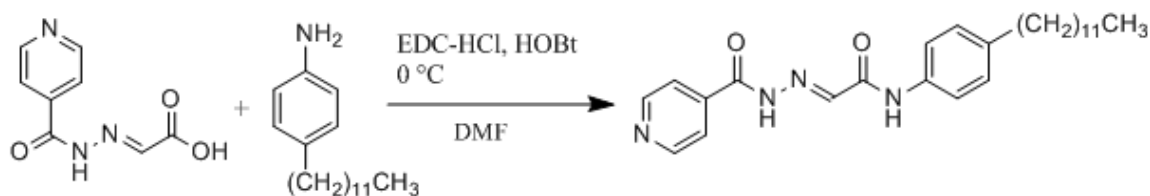
IR: 3419, 3239 (ν (N-H)), 2917, 2851, 1683, 1669 (ν (C=O) amid), 1553, 1531, 1516, 1497, 1414, 1303, 1293, 1278, 1087, 1007, 849, 820, 750, 685, 652, 646 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 70.56; H, 7.90; N, 13.71, nalezeno: C, 70.63; H, 8.00; N, 13.67.

4.1.2.16 (*E*)-*N*-(4-Dodecylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamid

Navážka výchozí sloučeniny:

4-dodecylanilin 288 mg



Obrázek 42: Schéma přípravy (*E*)-*N*-(4-dodecylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinylden)acetamidu

Sumární vzorec:	C ₂₆ H ₃₆ N ₄ O ₂
Relativní molekulová hmotnost:	436,60
Popis:	Bílá krystalická látka
Výtěžek:	52 %
Teplota tání:	182,8 °C
R _f :	0,229

¹H NMR (500 MHz, THF-*d*₆): δ 11.60 (1H, s, CONHN), 9.82 (1H, s, CONH), 8.76-8.73 (2H, m, H2, H6), 7.78-7.68 (5H, m, N=CH, H3, H5, H2', H6'), 7.10 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, H3', H5'), 2.57 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, Ph-CH₂), 1.64-1.57 (2H, m, ²CH₂), 1.36-1.26 (18H, m, ³CH₂, ⁴CH₂, ⁵CH₂, ⁶CH₂, ⁷CH₂, ⁸CH₂, ⁹CH₂, ¹⁰CH₂, ¹¹CH₂), 0.89 (3H, t, *J* = 6.7 Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, THF): δ 163.55, 161.69, 151.48, 143.43, 140.77, 138.91, 137.44, 129.18, 122.04, 120.50, 36.21, 32.87, 32.56, 30.63, 30.59, 30.54, 30.49, 30.30, 30.21, 25.81, 23.56, 14.43.

IR: 3413, 3240 (ν(N-H)), 2918, 2851, 1672 (ν(C=O) amid), 1597, 1553, 1519, 1471, 1414, 1366 1291, 1257, 1156, 1086, 1006, 930, 842, 751, 684, 649 cm⁻¹.

EA: vypočteno: C, 71.53; H, 8.31; N, 12.83, nalezeno: C, 71.48; H, 8.26; N, 12.86.

4.2 Biologická část

4.2.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity (68)

Připravené deriváty byly hodnoceny *in vitro* jako potenciální antimykobakteriální látky. Testovanými kmeny byly *Mycobacterium tuberculosis* 331/88 (tj. plně citlivý kmen H₃₇Rv) v ředění 10⁻³ a dva kmeny netuberkulózních (atypických) mykobakterií: *Mycobacterium avium* 330/88 (rezistentní na isoniazid, rifampicin, ofloxacin a ethambutol) v ředění 10⁻⁵, *Mycobacterium kansasii* 139/18 (ředění 10⁻⁴). Kmeny byly získány z České národní sbírky typových kultur.

Stanovení minimálních inhibičních koncentrací bylo prováděno mikrometodou v Šulově půdě (SEVAC, Praha, Česká republika) v plastických P-destičkách. Testované látky byly přidány v roztoku DMSO tak, aby výsledné koncentrace činily 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,064 a 0,032 μM. MIC hodnoty byly odečteny po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C, u *M. kansasii* navíc i po 7 dnech.

Dvě nejlepší sloučeniny: **11** a **12** byly testovány proti MDR-TB kmenům a jednomu XDR-TB kmeni. Bylo testováno sedm kmenů *Mycobacterium tuberculosis* (234/2005, 9449/2007, 7357/1998, 8666/2010, Praha 1, Praha 4 a Praha 131) v ředění 10⁻³. Kmeny byly získány z České národní sbírky typových kultur. Stanovení minimálních inhibičních koncentrací bylo prováděno opět mikrometodou v Šulově půdě (SEVAC, Praha, Česká republika) v plastických P destičkách. Testované látky byly přidány v roztoku DMSO tak, aby výsledné koncentrace činily 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,064 a 0,032 μM. MIC hodnoty byly odečteny po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C.

Všechny sedm testovaných kmenů je rezistentních na INH, rifampicin, rifabutin a streptomycin a v některých případech byla pozorována rezistence také na jiná léčiva. Kmen Praha 1 je rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin, streptomycin, ethambutol a klofazimin; Praha 4 rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin, streptomycin, ethambutol, ofloxacin a klofazimin; 234/2005 rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin, streptomycin a ethambutol; 9449/2006 rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin a streptomycin; 7357/1998 rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin, streptomycin, ethambutol a ofloxacin; 8666/2010 rezistentní na INH, rifampicin, rifabutin, streptomycin, ethambutol, ofloxacin a klofazimin. Kmen XDR-TB Praha 131 je odolný vůči INH, rifampicinu, rifabutinu, streptomycinu, ethambutolu, ofloxacinu, gentamicinu a amikacinu.

MIC hodnota udává nejnižší koncentraci, při které byla pozorována úplná inhibice růstu mykobakterií. Jako referenční látka byl použit isoniazid, antituberkulotikum 1. linie a zároveň syntetický prekursor hodnocených sloučenin, který byl naředěn sterilní destilovanou vodou. Testování antimykobakteriální aktivity bylo provedeno externě ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, laboratoři pro diagnostiku mykobakterií a tuberkulózy, pod vedením RNDr. Jiřiny Stolařikové.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Chemická část

Bylo připraveno celkem šestnáct substituovaných *N*-fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů (jednotlivé substituenty jsou uvedeny v tabulce 2 na stránce 29). Sloučeniny se lišily v substituci anilinu – byl monosubstituovaný v poloze 3 nebo 4, disubstituované aniliny byly substituované v poloze 3 a 4 nebo 3 a 5. Bylo připraveno pět halogenderivátů (**1-5**), jeden nitro derivát (**6**) a deset alkylovaných derivátů (**7-16**), konkrétně jsou uvedeny v tabulce 3. Sloučeniny jsou lipofilní, aby se mohly dostat pasivní difuzí skrz buněčnou stěnu mykobakterií. U monofluorovaných a nitro sloučenin není vliv na zvýšení lipofility jednoznačný, ale tyto funkční skupiny se často vyskytují v řadě sloučenin s antimykobakteriální aktivitou. (69) (70) Všechny připravené deriváty jsou však významně lipofilnější než výchozí prekursor INH a INHA. Substituenty a jejich poloha na benzenovém jádře anilinu byly zvoleny tak, aby doplnily současně připravovanou sérii. Zastoupeny jsou tak skupiny s různými elektronovými i sterickými efekty. Kladný mezomerní a současně záporný indukční efekt mají halogenové substituenty (**1-3**), CF₃ skupina vykazuje záporný indukční efekt (**4**), záporný indukční a mezomerní efekt má nitro skupina (**6**), alkyly (**7-16**) jsou nositeli kladného indukčního efektu. Delší alkyly a *terc*-butyl (**13**) jsou stericky náročné.

INHA byla připravena reakcí isoniazidu rozpuštěném ve směsi acetonitrilu a vody s roztokem monohydrátu kyseliny glyoxalové v demineralizované vodě. (66) Reakce probíhala rychle a poskytovala vysoký, prakticky kvantitativní výtěžek. Také purifikace nebyla obtížná.

Anilidy byly připraveny reakcí INHA s příslušnými aniliny v prostředí DMF za snížené teploty couplingem pomocí karbodiimidů, konkrétně EDC.HCl, který se přidával v mírném nadbytku. (60) Nízká teplota a HOBt zamezují tvorbě vedlejších produktů. Výhodou této reakce je snadné čištění, protože nezreagovaná kyselina, HOBt, EDC.HCl a močovina (vznikající reakcí z EDC.HCl) jsou rozpustné ve vodě a/nebo vodném roztoku hydrogenuhličitanu sodného a dají se odstranit vytřepáním v dělicí nálevce, kdežto připravené amidy zůstávají rozpuštěné v organické fázi (dichlormethan nebo ethyl-acetát), ze které byly posléze vysráženy přidávkem hexanu.

Reakce mají přijatelné až velmi dobré výtěžky, které se pohybují mezi 38 % a 94 %, ale ve většině případů byly výtěžky vyšší než 60 %. Reakce probíhaly zpravidla bez komplikací, některé sloučeniny bylo potřeba čistit rekrystalizací, protože vznikal (podle NMR) vedle majoritního *trans* isomeru také minoritní *cis* isomer produktu. (*E*)-*N*-(3-Fluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid **1** byl rekrystalizován z ethanolu a (*E*)-*N*-(3,4-dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid **8** byl rekrystalizován z diethyletheru. Nejvyšší výtěžky poskytovaly sloučeniny s krátkými a středními alifatickými řetězci. Hůře se připravovaly sloučeniny s dlouhými alifatickými řetězci (**15** a **16**), protože byly špatně rozpustné v použitých rozpouštědlech a před přenesením do dělicí nálevky se směs musela zahřát. Nitro derivát **6** nebyl stabilní za vyšších teplot, proto musel být vysušen pomocí sníženého tlaku.

Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány a získány v dostatečném množství a požadované čistotě pro plánované hodnocení biologické aktivity.

5.2 Biologická část

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

Výsledky měření MIC jsou uvedené v tabulce 4, nejlepší hodnoty jsou zvýrazněny tučně.

Kód	MIC [μ M]						
	<i>Mtb.</i> 331/88		<i>M. avium</i> 330/88		<i>M. kansasii</i> 235/80		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
1	0,25	0,25	>1000	>1000	2	4	8
2	0,25	0,5	>1000	>1000	4	8	8
3	0,25	0,25	>250	>250	2	4	8
4	0,25	0,25	>1000	>1000	2	4	8
5	0,125	0,25	>1000	>1000	2	4	8
6	0,125	0,25	>250	>250	4	8	8
7	0,125	0,25	>1000	>1000	2	4	4
8	0,125	0,25	>250	>250	2	4	4
9	0,125	0,25	>1000	>1000	2	4	4
10	0,25	0,5	>1000	>1000	4	8	8
11	0,125	0,125	>250	>250	2	4	4
12	0,064	0,125	>250	>250	2	4	4
13	0,125	0,5	>250	>250	2	4	8
14	0,125	0,25	>250	>250	2	4	8
15	0,125	0,25	>250	>250	2	4	8
16	0,25	0,25	>250	>250	4	4	8
INHA	0,25	0,5	250	>250	4	4	8
INH	0,5	0,5	>250	>250	1	2	2

Tabulka 3: Změřené MIC proti *Mtb.*, *M. avium* a *M. kansasii*

Zkratky použité v tabulce:

INHA isoniazid

INH 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octová kyselina

Mtb. *Mycobacterium tuberculosis*

5.2.2 Výsledky hodnocení aktivity proti rezistentním kmenům

Dvě nejlepší sloučeniny byly testovány také proti MDR-TB a jednomu XDR-TB (Praha 131) kmeni. Výsledky MIC jsou uvedeny v tabulce 4.

Kmen	MIC [μM]			
	Sloučenina 11		Sloučenina 12	
	14 d	21 d	14 d	21 d
234/2005	32	64	32	64
9449/2007	32	32	32	32
7357/1998	32	64	32	64
8666/2010	16	32	16	32
Praha 1	32	32	32	32
Praha 4	16	32	32	32
Praha 131	32	64	32	64

Tabulka 4: MIC proti rezistentním kmenům

5.3 Diskuze – biologická část

Aktivita syntetizovaných látek byla testována *in vitro*. Testování bylo provedeno externě ve Zdravotním ústavu se sídlem v Ostravě, v laboratoři pro diagnostiku mykobakterií a tuberkulózy, pod vedením RNDr. Jiřiny Stolaříkové. Testování bylo provedeno na kmenech *Mtb.*, *M. avium* a *M. kansasii* a pro dva vybrané neúčinnější deriváty také na sedmi MDR-TB kmenech, z nichž jeden byl XDR-TB. Hodnoty MIC byly odečteny po 14 a 21 dnech, v případě *M. kansasii* také po 7 dnech. Jako referenční látka byl použit výchozí isoniazid. Výsledky jsou sumarizovány v tabulkách 3 a 4.

Rozsah MIC připravených sloučenin proti *Mtb.* po 14 dnech byl od 0,064 μM do 0,25 μM . Nejlepší výsledky měl (*E*)-*N*-(4-butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid **12**. MIC isoniazidu měřená za stejných podmínek byla 0,5 μM . Rozsah MIC připravených sloučenin proti *Mtb.* po 21 dnech byl od 0,125 μM do 0,5 μM , MIC isoniazidu byla 0,5 μM . Proti *Mtb.* vykazovaly lepší aktivitu deriváty **5-9** a **11-15**, ostatní byly srovnatelné s INH i navzájem. Antimykobakteriální aktivita se zvyšovala s prodlužujícím se alkylovým řetězcem až po butyl, pak se aktivita zase mírně snižovala. Rozvětvení alkylového řetězce aktivitu nezvyšuje (*terc*-butyl derivát **13**). Dobré výsledky měly také sloučeniny s dvěma methyly (**8** a **9**) a s nitro skupinou (**6**). Poněkud horší výsledky vykazovaly sloučeniny substituované halogeny (**1-5**), přesto ale jejich hodnoty MIC byly nízké v rozmezí 0,125-0,5 μM .

Nové sloučeniny mají oproti isoniazidu srovnatelnou nebo mírně horší aktivitu proti *M. kansasii*. MIC byla v rozsahu od 2 μM do 4 μM měřena po sedmi dnech a od 4 μM do 8 μM měřena po 14 a 21 dnech. Deriváty substituované methyly (**7-9**), propylem **11** a butylem **12** jsou ale s INH aktivitou plně srovnatelné. Stejnou nebo srovnatelnou aktivitu mají také proti *M. avium*, kde je ovšem aktivita celkově v porovnání s ostatními kmeny zanedbatelná s hodnotami MIC $\geq 250 \mu\text{M}$. Jako nejúčinnější se ukázala kyselina INHA.

Dvě nejlepší sloučeniny byly testovány proti MDR-TB – (*E*)-*N*-(4-butylyfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid **12** a (*E*)-*N*-(propylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamid **11**. MIC proti sedmi různým kmenům byla od 16 do 32 μM měřená po 14 dnech a od 32 μM do 64 μM měřená po 21 dnech. Sloučeniny byly proti MDR-TB podstatně méně účinné než vůči plně lékově citlivému kmenu *Mtb.* H₃₇Rv (331/88), s největší pravděpodobností kvůli zkřížené rezistenci s parentním isoniazidem. Zároveň nebyl zjištěn rozdíl v aktivitě vůči MDR kmenům a XDR-TB.

V porovnání s INHA měly z připravených derivátů lepší aktivitu proti *Mtb.* jenom deriváty **11** a **12**, ostatní byly srovnatelné. Výsledky proti *M. avium* a *M. kansasii* byly také srovnatelné. Přestože jsou nově připravené deriváty výrazně lipofilnější, jejich aktivitu to oproti INHA příliš nezvyšuje. Jednoznačný vliv lipofility na biologickou aktivitu nebyl potvrzen, protože deriváty s nejdelším alkylovým řetězcem (**15** a **16**) měly horší aktivitu než sloučeniny se středně dlouhými alkylovými řetězci (**11** a **12**).

6 Závěr

Bylo připraveno šestnáct finálních amidů 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny s různě substituovanými aniliny, patnáct bylo originálních a jeden byl již popsán dříve. Byla také připravena již dříve známá INHA. Substituenty byly vybrány tak, aby doplnily již existující sérii analog isoniazidu. 2-(2-Isonikotinoylhydrazono)octová kyselina byla získána kondenzační reakcí isoniazidu s glyoxalovou kyselinou s prakticky kvantitativním výtěžkem. Metodou přípravy amidů byla tvorba amidové vazby z kyseliny a substituovaných anilinů pomocí karbodiimidu (EDC.HCl) za chlazení a přítomnosti HOBt. Výtěžky byly velmi dobré, většinou nad 60 %.

Všechny nové sloučeniny mají lepší nebo srovnatelnou aktivitu proti *Mtb.* v porovnání s isoniazidem. Antimykobakteriální aktivita se zvyšovala s prodlužujícím se alkylovým řetězcem až po butyl, pak se aktivita zase mírně snižovala. Rozvětvení alkylového řetězce aktivitu nezvyšuje. Dobré výsledky měly také sloučeniny s dvěma methyly a s nitro skupinou, naopak mírně vyšší hodnoty MIC vykazovaly sloučeniny s halogeny navázanými přímo na benzenové jádro.

Nejlepší aktivita proti *Mtb.* byla prokázána u (*E*)-*N*-(4-butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu, jeho MIC byla 0,064-0,125 μM . Velice dobrou aktivitu měl také (*E*)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)-*N*-(4-propylfenyl)acetamid, jeho MIC byla 0,125 μM . Pro srovnání – MIC isoniazidu je 0,5 μM , a došlo tedy ke zvýšení aktivity. Bohužel byla v případě multilékově rezistentních kmenů zjištěna zkřížená rezistence s isoniazidem. Sloučeniny mají aktivitu i proti *M. kansasii*, mnohé jsou zcela srovnatelné s isoniazidem, naopak *in vitro* účinnost vůči *M. avium* je všeobecně nízká.

Připravené látky mají i v porovnání s jinými „me-too“ deriváty isoniazidu velice dobrou aktivitu. V dalším kroku budou testované na cytotoxicitu, především na toxicitu pro jaterní buňky s ohledem na známou hepatotoxicitu isoniazidu. Dále bude experimentálně potvrzen také mechanismus účinku, kde předpokládáme vzhledem ke strukturní podobnosti a zkřížené rezistenci inhibici syntézy mykolových kyselin analogicky isoniazidu.

7 Seznam obrázků

Obrázek 1: Strukturní vzorec isoniazidu.....	12
Obrázek 2: Strukturní vzorec rifampicinu	13
Obrázek 3: Strukturní vzorec pyrazinamidu	13
Obrázek 4 Strukturní vzorec ethambutolu	14
Obrázek 5: Strukturní vzorec streptomycinu	14
Obrázek 6: Strukturní vzorec bedachilinu	16
Obrázek 7: Struktura delamanidu	16
Obrázek 8: Obecná struktura fluorochinolonů.....	16
Obrázek 9: Struktura ethionamidu	17
Obrázek 10: Struktura cykloserinu a terizidonu	17
Obrázek 11: Struktura linezolidu	17
Obrázek 12: Struktura klofaziminu.....	18
Obrázek 13: Obecná struktura sloučenin INH s různými aniliny spojené karbonylem.....	21
Obrázek 14: Struktura LL-3858 (51)	21
Obrázek 15: Strukturní vzorec triazinových hybridů.....	21
Obrázek 16: <i>N'</i> -{2-[(6-Methoxy-2-methylchinolin-4-yl)oxy]acetyl} isonikotinohydrazid	22
Obrázek 17: Obecná struktura sloučenin vzniklých reakcí substituovaných benzaldehydů s INH	22
Obrázek 18: Obecný vzorec sloučenin INH s 3-substituovanými 2-hydroxyacetofenony.	23
Obrázek 19: Obecný vzorec sloučenin isoniazidu s anilinem spojených CH fragmentem	23
Obrázek 20: Obecná struktura sloučenin isoniazidu s různě substituovanými aniliny spojené kyselinou pyrohroznovou	23
Obrázek 21: Obecná struktura furoxanových hybridů.....	24
Obrázek 22: Struktura triazolového hybridu s nejlepší <i>in vitro</i> aktivitou.....	24
Obrázek 23: Obecná struktura <i>N</i> -alkyl-5-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazol-2-aminů.....	25
Obrázek 24: 4-(5-substituované-1,3,4-oxadiazoly-2-yl)pyridiny	25
Obrázek 25: Syntéza 2-(2-isonikotinoylhydrazono)octové kyseliny.....	28
Obrázek 26: Schéma přípravy <i>N</i> -fenyl-2-(2-isonikotinoylhydrazono)acetamidů	29
Obrázek 27: Schéma přípravy (<i>E</i>)- <i>N</i> -(3-fluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	31

Obrázek 28:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(3-jodfenyl)acetamidu	32
Obrázek 29:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,4-difluorfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu	33
Obrázek 30:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -[3-(trifluormethyl)fenyl]acetamidu	34
Obrázek 31:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -[3-(trifluormethoxy)fenyl]acetamidu.....	35
Obrázek 32:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(3-nitrofenyl)acetamidu	36
Obrázek 33:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(<i>m</i> -tolyl)acetamidu	37
Obrázek 34:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,4-dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	38
Obrázek 35:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(3,5-dimethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	39
Obrázek 36:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-ethylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	40
Obrázek 37:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(4-propylfenyl)acetamidu	41
Obrázek 38:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-butylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	42
Obrázek 39:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -[4-(<i>terc</i> -butyl)fenyl]-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	43
Obrázek 40:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)- <i>N</i> -(4-pentylfenyl)acetamidu.....	44
Obrázek 41:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-decylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	45
Obrázek 42:	Schéma přípravy	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(4-dodecylfenyl)-2-(2-isonikotinoylhydrazinyliden)acetamidu.....	46

8 Seznam tabulek

Tabulka 1: Tabulka WHO 2016 klasifikace léčiv používaných proti MDR-TB (23)	15
Tabulka 2: Substituenty použité při syntézách a přiřazené kódy.....	29
Tabulka 3: Změřené MIC proti <i>Mtb.</i> , <i>M. avium</i> a <i>M. kansasii</i>	51
Tabulka 4: MIC proti rezistentním kmenům	52

9 Reference

1. WHO. Global Tuberculosis Report. [Online] 15. 10 2020. [Citace: 26.. květen 2021.] <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
2. World Health Organization. *Latent tuberculosis infection*. [Online] 2018. [Citace: 24. červen 2021.] https://www.who.int/tb/areas-of-work/preventive-care/ltbi_factsheet_2march18.pdf?ua=1.
3. M. Vašáková, I. Hricíková, E. Kopecká. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. *Remedia*. 26, 2016, Sv. 3, stránky 236-241.
4. S. Fatima, A. Kumari, G. Das, et al. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sciences*. 2020, Sv. 252, 117594.
5. J. Wallenfels, M. Vašáková, I. Solovič. Aktuální farmakoterapie tuberkulózy. *Klinická farmakologie a farmacie*. 32, 2018, Sv. 4, stránky 10-14.
6. Solovič, I. Tuberkulóza – aktuálny problém aj v novom miléniu. *Neurologie pro praxi*. 20, 2019, Sv. 2, stránky 91-97.
7. M. Ptáková. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Medicína pro praxi*. 8, 2011, Sv. 11, stránky 466-468.
8. P. Diviš. Tuberkulom mozku. *Neurologie pro praxi*. 14, 2013, Sv. 4, stránky 203-205.
9. S. Nayak, B. Acharjya. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatology Online Journal*. 3, 2021, Sv. 1, stránky 2-6.
10. J. R. Starke. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition)*. místo neznámé : Elsevier , 2012.
11. NHS. *Tuberculosis - Treatment*. [Online] 12. listopad 2019. [Citace: 19. květen 2021.] <https://www.nhs.uk/conditions/tuberculosis-tb/treatment/>.
12. H. A. Wilkinson, E. J. Ferris, A. L. Muggia, et al. Central nervous system tuberculosis: a persistent disease. *Journal of Neurosurgery*. 34, 1971, Sv. 1, stránky 15-22.
13. M. Zunza, D. M. Gray, T. Young, et al. Isoniazid for preventing tuberculosis in HIV-infected children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 8, 2017, CD006418.

14. G. S. Timmins, V. Deretic. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Biology*. 62, 2006, Sv. 5, stránky 1220-1227.
15. P. Wang, K. Pradhan, X. Zhong, et al. Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 6, 2016, Sv. 5, stránky 384-392.
16. W. Wehrli. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Reviews of Infectious Diseases*. 5, 1983, Sv. S3, stránky S407-S411.
17. R. S. Vardanyan, V. J. Hruby. Antimycobacterial drugs. *Synthesis of Essential Drugs*. místo neznámé : Elsevier, 2007, stránky 525-534.
18. R. Drew. UpToDate. *Pyrazinamide: An overview*. [Online] 17. leden 2020. [Citace: 20. květen 2021.] <https://www.uptodate.com/contents/pyrazinamide-an-overview>.
19. P. Gopal, J. P. Sarathy, M. Yee, at al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nature*. 11, 2020, 1661.
20. R. Goude, A. G. Amin, D. Chatterjee, at al. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 2009, Sv. 10, stránky 4138-4146.
21. J. F. Vianna, K. S. Bezerra, J. Oliveira, et al. Binding energies of the drugs capreomycin and streptomycin in complex with tuberculosis bacterial ribosome subunits. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 21, 2019, Sv. 35, stránky 19192-19200.
22. World Health Organization. *Tuberculosis*. [Online] 2009. [Citace: 19. květen 2021.] <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/>.
23. D. Falzon, H. J. Schünemann, E. Harausz, et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *European Respiratory Journal*. 49, 2017, Sv. 3, 1602308.
24. S. Tiberi, A. Scardigli, R. Centis, et al. Classifying new anti-tuberculosis drugs: rationale and future perspectives. *International Journal of Infectious Diseases*. 56, 2017, stránky 181-184.
25. WHO. *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis*. [Online] 2016. [Citace: 20. duben 2021.] <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250125/9789241549639-eng.pdf>.

26. J. P. Sarathy, G. Gruber, T. Dick. Re-Understanding the Mechanisms of Action of the Anti-Mycobacterial Drug Bedaquiline. *Antibiotics*. 8, 2019, Sv. 4, 261.
27. J. M. Lewis, D. J. Sloan. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 13, 2015, Sv. 11, stránky 779-91.
28. J. M. Blondeau. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*. 49, 2004, Sv. 2, 2, stránky 73-78.
29. K. M. Krause, A. V. Serio, T. R. Kane, et al. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6, 2016, Sv. 6, a027029.
30. S. K. Johansen, C. E. Maus, B. B. Plikaytis, et al. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular Cell*. 23, 2006, Sv. 2, stránky 173-182.
31. F. Wang, R. Langley, G. Gulten, et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *Journal of Experimental Medicine*. 204, 2007, Sv. 1, stránky 73-78.
32. M. R. Ramanathan, C. K. Howell, J. M. Sanders. Drugs in Tuberculosis and Leprosy. *Side Effects of Drugs Annual*. 40, 2018, stránky 363-376.
33. Linezolid. *Drugbank*. [Online] 13.. červen 2005. [Citace: 20. . srpen 2021.] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00601>.
34. Clofazimine. *Drugbank*. [Online] 13.. červen 2005. [Citace: 20. . srpen 2021.] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00845>.
35. M. Krátký, J. Vinšová. Pokrok ve vývoji antituberkulotik působící na multilékově rezistentní kmeny. *Chemické listy*. 104, 2010, stránky 998-1005.
36. E. Krejčí. Vzdávající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. *Medicína pro praxi*. 17, 2020, Sv. 1, stránky 8-12.
37. S. Luthra, A. Rominsk, P. Sander. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance. *Frontiers in Microbiology*. 12, 2018, Sv. 9, 2179..

38. G. Zhang, J. Feng. The intrinsic resistance of bacteria. *Yi Chuan.* 38, 2016, Sv. 10, stránky 872-880.
39. A. Hoek, D. Mevius, B. Guerra, et al. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Frontiers in Microbiology.* 2, 2011, Sv. 203.
40. V. Bártů. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína pro praxi.* 9, 2007, Sv. 9, stránky 372-373.
41. M. J. Culyba, C. Y. Mo, R. M. Kohli. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry.* 54, 2015, Sv. 23, stránky 3573-3582.
42. M. Nasiruddin, M. K. Neyaz, S. Das. Nanotechnology-Based Approach in Tuberculosis Treatment. *Tuberculosis Research and Treatment.* 2017, 2017.
43. L. Nguyen. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Archives of Toxicology.* 90, 2016, Sv. 7, stránky 1585-1604.
44. K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, et al. Quinolones: action and resistance updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 9, 2009, Sv. 11, stránky 981-998.
45. T. Smith, K. A. Wolff, L. Nguyen. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2013, 374, stránky 53-80.
46. J. Tao, J. Han, H. Wu, et al. *Mycobacterium* fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Research.* 41, 2013, Sv. 4, stránky 2370-2381.
47. W. M. Eldehna, M. Fares, M. M. Abdel-Aziz, et al. Design, Synthesis and Antitubercular Activity of Certain Nicotinic Acid Hydrazides. *Molecules.* 5, 2015, Sv. 20, stránky 8800-8815.
48. Y. Q. Hu, S. Zhang, F. Zhao, et al. Isoniazid derivatives and their anti-tubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 133, 2017, stránky 255-267.
49. T. Scior, S. J. Garcés-Eisele. Isoniazid is not a lead compound for its pyridyl ring derivatives, isonicotinoyl amides, hydrazides, and hydrazones: a critical review. *Current Medicinal Chemistry.* 13, 2006, Sv. 18, stránky 2205-2219.

50. Z. Rychtarčíková, M. Krátký, M. Gazvoda et al. *N*-Substituted 2-Isonicotinoylhydrazinecarboxamides — New Antimycobacterial Active Molecules. *Molecules*. 19, 2014, stránky 3851-3868.
51. Autor neznámý. LL-3858. *Tuberculosis*. 88, 2008, Sv. 2, str. 126.
52. N. Sunduru, L. Gupta, V. Chaturvedi, et al. Discovery of new 1,3,5-triazine scaffolds with potent activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45, 2010, Sv. 8, stránky 3335-3345.
53. S. Eswaran, A. V. Adhikari, N.K. Pal, et al. Design and synthesis of some new quinoline-3-carbohydrazone derivatives as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20, 2010, Sv. 3, stránky 1040-1044.
54. M. Shaharyar, A. A. Siddiqui, M. A. Ali, et al. Antimycobacterial activity of novel *N*-(substituted)-2-isonicotinoylhydrazinocarbothioamide endowed with high activity towards isoniazid resistant tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16, 2006, stránky 3947-3949.
55. J. Sandy, A. Mushtaq, A. Kawamura, et al. The Structure of Arylamine *N*-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*—An Enzyme which Inactivates the Anti-tubercular Drug, Isoniazid. *Jurnal of Molecular Biology*. 318, 2002, Sv. 4, stránky 1071 - 1083.
56. H. S. Kumar, T. Parumasivam, F. Jumaat, et al. Synthesis and evaluation of isonicotinoyl hydrazone derivatives as antimycobacterial and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Research*. 23, 2014, stránky 269-279.
57. D. Sriram, P. Yogeewari, K. Madhu. Synthesis and in vitro and in vivo antimycobacterial activity of isonicotinoyl hydrazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15, 2005, Sv. 20, stránky 4502-4505.
58. E. Vavříková, S. Polanc, M. Kočevár, et al. New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46, 2011, Sv. 12, stránky 5902-5909.
59. V. Pflégr, L. Horváth, J. Stolaříková, et al. Design and synthesis of 2-(2-isonicotinoylhydrazineylidene)propanamides as InhA inhibitors with high antitubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 223, 2021, 113668.

60. G. F. dos S. Fernandes, P. C. de Souza, L.B. Marino, et al. Synthesis and biological activity of furoxan derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 123, 2016, Sv. 10, stránky 523-531.
61. F. Mir, S. Shafi, M. S. Zaman, et al. Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 138, 2014, stránky 274-283.
62. D. Kumara, Beenaa, G. Khare, et al. Synthesis of novel 1,2,3-triazole derivatives of isoniazid and their in vitro and in vivo antimycobacterial activity evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 81, 2014, stránky 301-313.
63. R. Vosátka, M. Krátký, M. Švarcová, et al. New lipophilic isoniazid derivatives and their 1,3,4-oxadiazole analogues: Synthesis, antimycobacterial activity and investigation of their mechanism of action. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 151, 2018, str. 824-835.
64. G. Navarrete-Vázquez, G. M. Molina-Salinas, Z. V. Duarte-Fajardo, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of 4-(5-substituted-1,3,4-oxadiazol-2-yl)pyridines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15, 2007, Sv. 16, stránky 5502-5508.
65. F. A. Kondrashov, E. V. Koonin, I. G. Morgunov, et al. Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biology Direct*. 1, 2006, Sv1, 31.
66. Y. B. Sutar, J. K. Mali, V. N. Telvekar, et al. Transferrin conjugates of antitubercular drug isoniazid: Synthesis and in vitro efficacy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 183, 2019, 111713.
67. A. I. El-Sebai, R. Soliman, S. M. Rida. Synthesis of some new acid hydrazides structurally related to certain tuberculostatic agents. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 14, 1973, stránky 67-73.
68. M. Krátký, J. Vinšová, E. Novotná, et al. Antibacterial Activity of Salicylanilide 4-(Trifluoromethyl)-benzoates. *Molecules*. 18, 2013, Sv. 4, stránky 3674-3688.
69. M. Artico, A. Mai, G. Sbardella, et al. Nitroquinolones with broad-spectrum antimycobacterial activity *in vitro*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 9, 1999, Sv. 12, stránky 1651-1656.

70. M. Dinakaran, P. Senthilkumar, P. Yogeewari, et al. Antimycobacterial activities of novel 2-(sub)-3-fluoro/nitro-5,12-dihydro-5-oxobenzothiazolo[3,2-*a*]quinoline-6-carboxylic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 2008, Sv. 6, stránky 3408-3418.