UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Pětičlenné dusíkaté heterocykly jako potenciální antituberkulotika

Pavel Sychra

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ 2017

Poděkování

Děkuji PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. a Ing. Galině Karabanovich, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a čas, který mi věnovali. Děkuji také Mgr. Janu Němečkovi za jeho trpělivost a pomoc při vypracování praktické i teoretické části práce. V neposlední řadě chci velice poděkovat prof. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc. za ochotu, vstřícný přístup a cenné rady.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorských dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 6.5.2017

Pavel Sychra

1. OBSAH

1. OBSAH 4

2. ABSTRAKT 7

3. ABSTRACT 9

4. ÚVOD 11

4.1 Tuberkulóza 11

4.2 Léčba tuberkulózy 11

4.2.1 Historie léčby tuberkulózy 11

4.2.2 Standardní léčba tuberkulózy 12

4.2.3 Lékově rezistentní tuberkulózy a jejich léčba 13

4.3 Vývoj nových potenciálních antituberkulotik 15

4.3.1 Známé molekuly, u nichž byla zjištěna antimykobakteriální aktivita 15

4.3.2 Nové chemické struktury s antimykobakteriální aktivitou 17

4.4 Základní struktury látek připravených na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK a jejich základní charakteristika 19

4.4.1 1-substituované 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a jejich izosterní analogy 19

4.4.2 2,5- a 1,5-disubstituované tetrazoly nesoucí dinitrobenzylsulfanylovou skupinu a jejich izosterní selenové analogy 20

4.4.3 2,5-disubstituované 1,3,4-oxadiazoly a 1,3,4-thiadiazoly nesoucí 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinu 21

5. CÍL PRÁCE 22

6. METODICKÁ ČÁST 25

6.1 Stručný přehled biologicky aktivních tetrazolů 25

6.2 Chemické vlastnosti 5-substituovaných tetrazolů 25

6.3 Syntéza 5-substituovaných tetrazolů 26

6.3.1 Reakce v kyselém prostředí nebo kysele katalyzované 26

6.3.2 Reakce s využitím Lewisových kyselin 28

6.3.3 Reakce s využitím azidů organokovových a organokřemičitých sloučenin 28

6.4 Funkcionalizace 5-substituovaných tetrazolů 29

6.5 Příprava antituberkuloticky aktivních derivátů tetrazolu 31

6.5.1 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů..... 31
6.5.2 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus 31
6.5.3 Převedení připravených derivátů tetrazolu obsahujících *N*-benzylpiperazin na jejich dihydrochloridy..... 32
6.6 Charakteristika oxadiazolů..... 33
6.7 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I..... 34
6.8 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu 35
6.9 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b 36

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 37
7.1 Chemikálie a přístroje 37
7.2 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů..... 38
7.2.1 Příprava 2- a 1-(3-fluorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 1a a 1b..... 38
7.2.2 Příprava 2- a 1-(4-methylbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 2a a 2b .. 40
7.2.3 Příprava 2- a 1-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 3a a 3b..... 41
7.2.4 Příprava 2- a 1-(3-methoxybenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 4a a 4b43
7.3 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus 45
7.3.1 Příprava derivátů s dvouuhlíkatým spojovacím řetězcem 45
7.3.2 Příprava derivátů s tříuhlíkatým spojovacím řetězcem 48
7.3.3 Příprava derivátů se čtyřuhlíkatým spojovacím řetězcem..... 52
7.3.4 Příprava dihydrochloridů látek 10a a 12a 54
7.4 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I..... 56
7.5 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu 57
7.5.1 Příprava esterů 16a-16d..... 58
7.5.2 Příprava hydrazidů 17a-17d 60
7.5.3 Acylace připravených hydrazidů 3,5-dinitrobenzoylchloridem 63
7.5.4 Příprava substituovaných oxadiazolů 15a-15d 66
7.6 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b 70

8. VÝSLEDKY A DISKUSE 72
8.1 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů..... 72
8.2 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus 73
8.3 Příprava dihydrochloridů látek 10a a 12a 75
8.4 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I..... 75

8.5 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu 76
8.6 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b 79
8.7 Testování antimykobakteriální aktivity *in vitro* 80
8.8 Testování cytotoxicity *in vitro* 85
8.9 Testování antimykotické a antibakteriální aktivity *in vitro* 86

9. ZÁVĚR 90

10. POUŽITÉ ZKRATKY 92

11. SEZNAM TABULEK 94

12. SEZNAM OBRÁZKŮ 95

13. POUŽITÁ LETERATURA 96

14. PŘÍLOHY 101
14.1 Publikace v odborném časopise 101
14.2 Národní patentový spis 102
14.3 Mezinárodní patentová přihláška PCT: 103

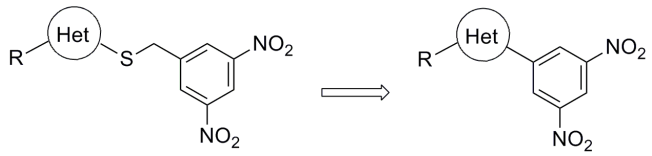
2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Pavel Sychra
Školitel: prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
Název práce: **Pětičlenné dusíkaté heterocykly jako potenciální antituberkulotika**

Tuberkulóza je velice časté infekční onemocnění, jehož původcem je především *Mycobacterium tuberculosis*. V roce 2015 bylo dle Světové zdravotnické organizace po celém světě registrováno 10,4 mil. nových případů onemocnění tuberkulózou a 1,8 mil. úmrtí způsobených tímto onemocněním.

V předchozí práci naší skupiny bylo zjištěno, že 2,5- a 1,5-disubstituované tetrazoly a 2,5-disubstituované oxadiazoly nesoucí 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinu vykazují vynikající antimykobakteriální aktivitu *in vitro*. Cílem této práce bylo modifikovat strukturu těchto látek odstraněním methylsulfanylového spojovacího řetězce a připravit tak sérii derivátů tetrazolu a oxadiazolu obsahujících 3,5-dinitrofenylovou skupinu.



Het = tetrazol, 1,3,4-oxadiazol

Obrázek 1: Obecný vzorec látek zkoumaných v této práci

Nejprve byla připravena série 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů reakcí 5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolu s různě substituovaným benzylhalogenidem. Další část práce se zabývala přípravou derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus. Nejdříve bylo nutné připravit alkylační činidla, která byla následně použita k alkylaci nasycených dusíkatých heterocyklů. U sloučenin s nasyceným dusíkatým heterocyklem, které vykazovaly vysokou antimykobakteriální aktivitu, byly připraveny jejich ve vodě rozpustné soli.

Dalším úkolem bylo připravit sérii 3,5-dinitrofenyl oxadiazolů. Byly použity dvě metody přípravy. První metodou byla reakce chloridu kyseliny s 5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolem, ale produkt nebyl izolován. Cílové oxadiazoly se podařilo získat reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu.

Z dvaceti připravených struktur byla u sedmnácti sloučenin hodnocena jejich antimykobakteriální aktivita a u vybraných látek jejich cytotoxicita. Některé z těchto sloučenin vykazovaly srovnatelnou či vyšší antimykobakteriální aktivitu než standardně používané antituberkulotikum isoniazid.

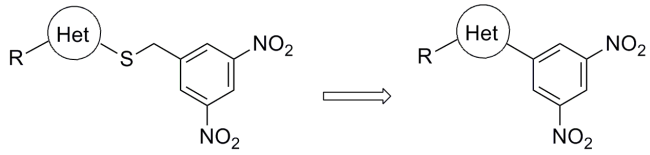
3. ABSTRACT

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

Candidate: Pavel Sychra
Supervisor: prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
Title of diploma thesis: **Five-members N-heterocycles as potential antituberculotics**

Tuberculosis is widespread infectious disease predominantly caused by *Mycobacterium tuberculosis*. According to World Health Organization, 10.4 million new cases of tuberculosis and 1.8 million deaths from tuberculosis were registered worldwide only in 2015.

In the previous work of our group it was found that 2,5- and 1,5-disubstituted tetrazoles and 2,5-disubstituted oxadiazoles bearing 3,5-dinitrobenzylsulfanyl fragment exhibited outstanding antimycobacterial activities. The aim of this work was to modify these lead structures by removing the methylsulfanyl linker and to prepare a series of 3,5-dinitrophenyl tetrazole and oxadiazole derivatives.



Het = tetrazole, 1,3,4-oxadiazole

Figure 1: General formula of the compounds studied in this work

Firstly, we prepared a series of 2- and 1-benzyl-5-(3,5-dinitrophenyl)-1*H*-tetrazoles by the reaction of 5-(3,5-dinitrophenyl)-1*H*-tetrazole with diversely substituted benzyl halide. In another part, we dealt with the preparation of tetrazole derivatives containing saturated nitrogen heterocycle. At first, it was necessary to prepare alkylating agents, which have been subsequently used for alkylation of saturated nitrogen heterocycles. Furthermore, several water-soluble analogs of compounds with saturated nitrogen heterocycle and high antimycobacterial activity were prepared.

The next task was to prepare a series of 3,5-dinitrophenyl oxadiazole derivatives. Two pathways were used. The first method was the reaction of acid chloride with 5-(3,5-dinitrophenyl)-1*H*-tetrazole, but the products were not isolated. Target oxadiazoles were obtained by the reaction of hydrazide with 3,5-dinitrobenzoylchloride and by the subsequent closure of oxadiazole ring.

Seventeen of twenty prepared structures were evaluated for their antimycobacterial activities and some of them for their effects on mammalian cell viability. Some of these compounds showed comparable or higher antimycobacterial activity than standard antitubercular drug isoniazid.

4. ÚVOD

4.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění způsobené mykobakteriemi *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* a *M. canettii*).[1] Nejčastěji se jedná o plicní formu, která se přenáší kapénkami (k nákaze stačí pouze několik vdechnutých kapének). V počátečním stádiu se TB projevuje kašlem, horečkou a nočním pocením. V pokročilém stádiu se vyskytují symptomy, jako je produktivní kašel s krví ve sputu, bolest na hrudi, úbytek hmotnosti a celková vyčerpanost. Rizikovou skupinou jsou imunodeficientní pacienti (např. pacienti s HIV infekcí, malnutricí, diabetici a kuřáci). V roce 2015 zemřelo dle WHO (Světová zdravotnická organizace) 35 % pacientů s infekcí HIV v důsledku současné nákazy tuberkulózou. Existuje také latentní forma TB, kterou je nakažena až třetina světové populace. U pacientů s latentní formou TB nejsou pozorovány symptomy typické pro TB. Jedná se o neinfekční stádium TB, avšak při oslabení imunitního systému či u imunodeficientních pacientů může dojít k propuknutí akutní fáze, čímž se zvýší riziko přenosu infekce do okolí.[2]

Přestože je TB léčitelná a je možná její prevence, v roce 2015 onemocnělo tuberkulózou 10,4 mil. lidí a bylo registrováno 1,8 mil. úmrtí v důsledku TB, přičemž 95 % případů úmrtí bylo hlášeno v rozvojových zemích.[2]

4.2 Léčba tuberkulózy

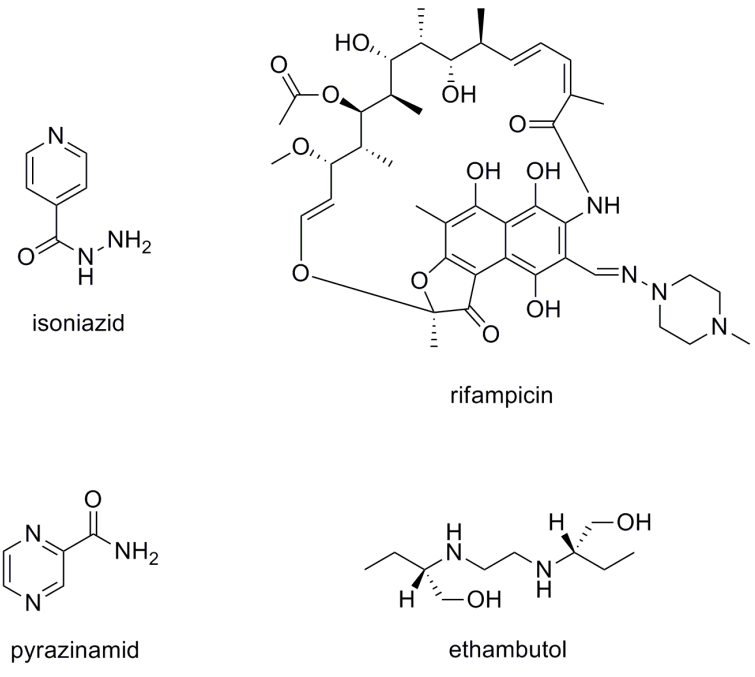
4.2.1 Historie léčby tuberkulózy

Ještě do poloviny dvacátého století spočívala léčba tuberkulózy v chirurgických zákrocích a pobytech v sanatoriích. Zlomovým okamžikem bylo objevení streptomycinu v roce 1944, který působil baktericidně proti *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis)*.[3] Krátce po jeho objevení bylo ale zjištěno, že monoterapie streptomycinem vede k častému selhání léčby a také k rozvoji lékové rezistence. Proto byla zavedena kombinace streptomycinu s kyselinou *p*-aminosalicylovou,

což vedlo k výraznému snížení těchto nežádoucích důsledků monoterapie. Důležitým zlomem v léčbě TB bylo také objevení isoniazidu a jeho přidání k dvoukombinaci streptomycinu a kyseliny *p*-aminosalicylové, což vedlo ke zvýšení počtu vyléčených ze 70 % na 95 %, ale léčba trvala 18-24 měsíců. Nakonec byla kyselina *p*-aminosalicylová nahrazena ethambutolem, který se stal společně s dalším léčivem pyrazinamidem důležitým především pro intenzivní fázi léčby. Ke zkrácení farmakoterapie došlo zavedením rifampicinu do kombinační léčby - u léčby bez pyrazinamidu na devět měsíců a s pyrazinamidem na šest měsíců.[4]

4.2.2 Standardní léčba tuberkulózy

Dnešní standardní léčba TB spočívá obvykle v šestiměsíční terapii, která je rozdělena do dvou fází. V intenzivní fázi, trvající dva měsíce, se využívá čtyřkombinace isoniazidu, rifampicinu, pyrazinamidu a ethambutolu (Obrázek 2). Poté následuje pokračovací fáze trvající obvykle čtyři měsíce, při které je podávána pouze dvoukombinace isoniazidu s rifampicinem.[5]



Obrázek 2: Základní používaná antituberkulotika

4.2.3 Lékově rezistentní tuberkulózy a jejich léčba

V poslední době představují problém lékově rezistentní formy tuberkulózy, jejichž nárůst je urychlen nevhodným užíváním antituberkulotik - nesprávná preskripce, užívání léčiv nízké kvality či předčasné ukončení léčby. Mezi lékově rezistentní formy tuberkulózy patří MDR-TB (multirezistentní tuberkulóza), která je rezistentní ke dvěma nejsilnějším antituberkulotikům první volby: isoniazidu a rifampicinu. V roce 2015 bylo po celém světě registrováno 480 000 případů MDR-TB, přičemž polovinu případů tvořila Čína, Indie a Ruská federace.[2]

MDR-TB je léčitelná pomocí léčiv druhé volby a v nezbytných případech také doplňkovými léčivy. K těmto léčivům byla postupně získávána data o jejich účinnosti a bezpečnosti, což vedlo k tomu, že v roce 2016 byla provedena jejich reklasifikace do těchto skupin: léčiva druhé volby (skupina A, B a C) a doplňková léčiva (skupina D). Nové rozvržení léčiv do jednotlivých skupin je znázorněno v následující tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled léčiv doporučovaných pro léčbu MDR-TB

Skupina A: fluorochinolony	levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin
Skupina B: injekční léčiva	amikacin, capreomycin, kanamycin, (streptomycin)
Skupina C: další léčiva druhé volby	ethionamid/protionamid, cykloserin/terizidon, linezolid, klofazimin
Skupina D: doplňková léčiva	**D1:** pyrazinamid, ethambutol, vysoké dávky isoniazidu
	D2: bedaquilin, delamanid
	D3: kyselina *p*-aminosalicylová, imipenem-cilastatin, meropenem, amoxicilin-klavulanát, thioacetazon

Zdroj: World Health Organization, 2016 (převzato)

Zatímco látky linezolid a klofazimin jsou přeřazeny ze skupiny doplňkových léčiv do skupiny léčiv druhé volby, u kyseliny *p*-aminosalicylové je tomu naopak. Další výraznou změnou je, že klarithromycin a další makrolidová antibiotika již nejsou doporučovány pro léčbu MDR-TB. Naopak užití streptomycinu je možné, avšak pouze jako náhrada za ostatní injekční léčiva druhé volby - tedy v případě, že aminoglykosidová antibiotika a capreomycin nemohou být použity. Léčiva ze skupiny D1 jsou přidávána k léčivům druhé volby v případě, že riziko interakcí,

rezistence a intolerance u látek druhé volby převažuje nad jejich benefity. Skupina D2 se skládá ze dvou nově zavedených léčiv, přičemž bedaquilin je doporučován pouze pro dospělé, avšak delamanid lze použít i u dětí a mladistvých ve věku 6-17 let. Léčiva skupiny D3 mohou být použita pouze v případě, kdy nedokážeme vybrat jiná léčiva do kombinace pěti léčiv v intenzivní fázi léčby MDR-TB (viz dále).[6]

U pacientů, u nichž byla MDR-TB diagnostikována poprvé, trvá konvenční léčba obvykle dvacet měsíců. V osmiměsíční intenzivní fázi konvenční léčby je doporučována kombinace pyrazinamidu a čtyř léčiv druhé volby - jedno léčivo ze skupiny A, další ze skupiny B a alespoň dvě léčiva ze skupiny C. Jestliže není možné takto vytvořit pětikombinaci léčiv, lze pro doplnění počtu použít léčiva ze skupin D2 a D3. Konvenční léčba může být dále posílena vysokými dávkami isoniazidu s/bez ethambutolu.[6] Výběr léčiv je empirický a při jejich výběru hrají roli tyto faktory: výskyt rezistencí v daném regionu, pacientem dříve užívaná léčiva a vedlejší účinky léčiv.[7]

V roce 2016 WHO schválila použití zkrácené léčby MDR-TB v délce 9-12 měsíců, a to u pacientů, u kterých je možné vyloučit rezistenci k fluorochinolonům a injekčním léčivům druhé volby.[6] Toto doporučení se opírá o několik observačních studií, provedených v posledních letech například v Bangladéši, Kamerunu či Nigérii.[8,9,10] Také byla zahájena multicentrická randomizovaná kontrolovaná studie, srovnávající výsledky konvenční a zkrácené léčby MDR-TB.[11] Zkrácená léčba je rozdělena do dvou fází. V intenzivní fázi, trvající obvykle čtyři měsíce, mohou být použita tato léčiva: gatifloxacin či moxifloxacin, kanamycin, protionamid, klofazimin, vysoké dávky isoniazidu, pyrazinamid a ethambutol. Následuje pokračovací fáze, obvykle trvající pět měsíců, která zahrnuje léčiva jako: gatifloxacin nebo moxifloxacin, klofazimin, pyrazinamid a ethambutol.[6] Zkrácená léčba není pouze levnější, ale další její výhodou je možné snížení počtu úmrtí díky lepší adherenci pacientů k této léčbě.[12]

Vážnější formu MDR-TB představuje tzv. XDR-TB (extenzivně rezistentní tuberkulóza), která je rezistentní k rifampicinu a isoniazidu, ale také k fluorochinolonům a nejméně k jednomu injekčnímu léčivu druhé volby (amikacin, capreomycin, kanamycin).[7] V roce 2015 představovala XDR-TB 9,5 % případů MDR-TB.[2] XDR-TB vyžaduje podstatně delší léčbu než MDR-TB a je zapotřebí užít léčiva jako linezolid, klofazimin nebo kombinaci amoxicilin-klavulanát či imipenem-cilastatin.

Tato léčba je finančně náročnější a použitá léčiva mohou vykazovat větší množství nežádoucích účinků.[7]

4.3 Vývoj nových potenciálních antituberkulotik

Vzhledem k narůstajícímu počtu rezistentních forem TB je zapotřebí vyvíjet nová antituberkulotika, která by měla naplnit tyto požadavky:

- větší účinnost než současná antituberkulotika nebo schopnost zkrátit nynější léčbu TB,
- nový mechanismus účinku umožňující léčbu lékově rezistentních forem TB,
- účinnost proti latentním formám TB,
- možnost zkombinovat tato léčiva s antivirotiky (kvůli časté koinfekci TB a HIV),
- kompatibilita s dalšími antituberkulotiky.

Několik potenciálních antituberkulotik se nyní nachází v klinickém testování. První skupinou jsou látky, které byly vyvinuty pro léčbu jiného onemocnění, avšak byla u nich zjištěna i schopnost působit proti mykobakteriím způsobujících TB (fluorochinolony, rifamyciny, oxazolidinony). Další skupinou jsou léčiva s antimykobakteriálním účinkem přímo vyvíjená jako potenciální antituberkulotika (bedaquilin, nitroimidazoly, SQ109, benzothiazinony).[7]

4.3.1 Známé molekuly, u nichž byla zjištěna antimykobakteriální aktivita

4.3.1.1 Fluorochinolony

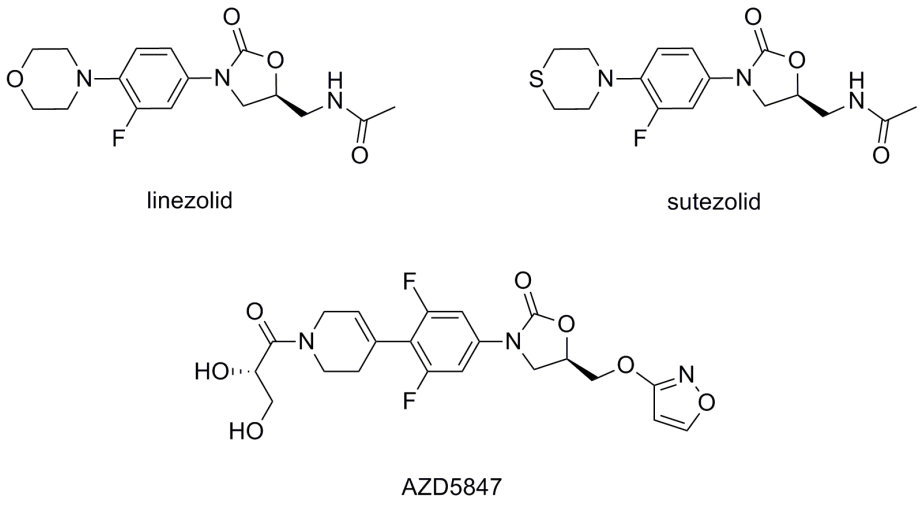
Jak již bylo řečeno, fluorochinolony jsou mimo jiné využívány jako léčiva druhé volby k léčbě MDR-TB. Avšak v posledních letech jsou prováděny klinické zkoušky na potenciální využití fluorochinolonů místo ethambutolu proti senzitivním kmenům TB. Výhodou je především zkrácení standardní šestiměsíční léčby TB na čtyři měsíce při záměně ethambutolu za gatifloxacin či ethambutolu/isoniazidu za moxifloxacin.[13] Problémem je však rozvoj rezistencí k fluorochinolonům kvůli jejich častému užívání v jiných indikacích.[7]

4.3.1.2 Rifamyciny

Kromě rifampicinu, který patří již několik desítek let mezi léčiva první volby v léčbě TB, do rifamycinů patří také rifapentin, který má ve srovnání s rifampicinem delší poločas účinku[14] a v kombinaci s isoniazidem je vhodný k léčbě latentní formy TB.[15]

4.3.1.3 Oxazolidinony

Mechanismus účinku oxazolidinonů spočívá v inhibici proteosyntézy vazbou na podjednotku 50S ribozomů bakterií.[7] Linezolid, oxazolidinon první generace, je vyvíjen pouze pro těžké formy MDR-TB[16] a XDR-TB[17]. Jeho nevýhodou jsou poměrně časté a významné vedlejší účinky jako anémie, trombocytopenie, laktátová acidóza, periferní a optická neuropatie.[6] V druhé fázi klinického testování se nachází analog linezolidu - sutezolid, který vykazuje vyšší baktericidní aktivitu.[18,19] Do druhé fáze také postoupil další zástupce oxazolidinonů - AZD5847, u něhož byla v porovnání s linezolidem rovněž zjištěna vyšší baktericidní aktivita.[20,21]

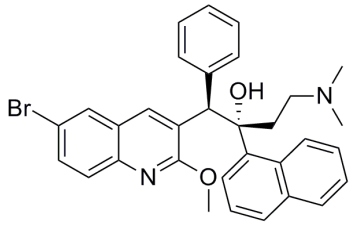


Obrázek 3: Struktura linezolidu, sutezolidu a AZD5847

4.3.2 Nové chemické struktury s antimykobakteriální aktivitou

4.3.2.1 Bedaquilin

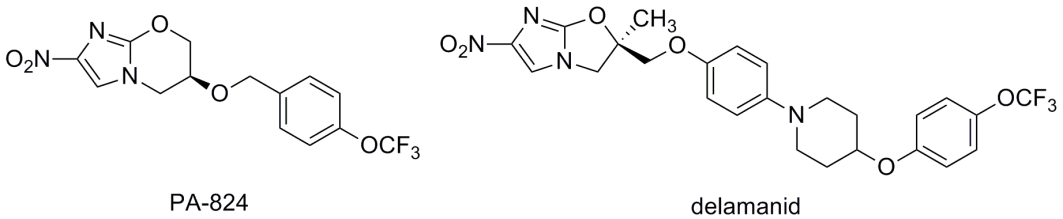
V roce 2012 schválil FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA) užití bedaquilinu v terapii dospělých s lékově rezistentní TB. Jednalo se tak o první látku po 40 letech, která byla schválena výhradně pro léčbu TB. Mechanismus účinku bedaquilinu spočívá v inhibici mykobakteriální ATP syntázy, což vede k poklesu intracelulární hladiny ATP (adenosintrifosfát) a následně k zániku mykobakterie.[22] Dlouhý poločas účinku je výhodný pro dávkové schéma bedaquilinu[23], avšak může také docházet k jeho ukládání do tkání.[24] Nežádoucím účinkem bedaquilinu je jeho schopnost vyvolat arytmii.[25]



Obrázek 4: Struktura bedaquilinu

4.3.2.2 Nitroimidazoly

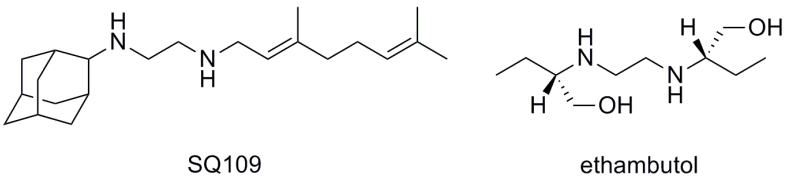
Hlavními zástupci nitroimidazolových derivátů jsou PA-824 a delamanid. Jedná se o proléčiva, která jsou pomocí deazaflavin-dependentních enzymů redukována na produkty, které inhibují například cytochrom c oxidázu či syntézu mykolových kyselin.[26] Obě látky jsou testovány v klinických studiích pro léčbu MDR-TB. PA-824 se nachází ve druhé fázi, zatímco delamanid postoupil již do třetí fáze a od roku 2016 je možné jeho využití v léčbě MDR-TB a to i u pacientů ve věku 6-17 let.[7,6]



Obrázek 5: Struktura PA-824 a delamanidu

4.3.2.3 SQ109

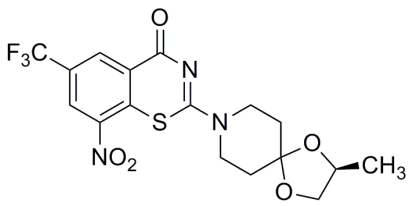
Tato látka se nachází ve druhé fázi klinického testování[7] a jedná se o možného nástupce ethambutolu, který je nejslabším článkem současné čtyřkombinace léčiv užívané při standardní léčbě TB. SQ109 i ethambutol obsahují ve své struktuře 1,2-ethylendiaminovou skupinu.[27] Obě látky zasahují do biosyntézy buněčné stěny, ale každá jiným způsobem. Ethambutol je inhibitorem arabinosyltransferázy, což vede k inhibici biosyntézy arabinogalaktanu. SQ109 inhibuje MmpL3 (transportér trehalóza monomykolátu), což vede k inhibici biosyntézy mykolové kyseliny. [7]



Obrázek 6: Struktura SQ109 a ethambutolu

4.3.2.4 Benzothiazinony

Benzothiazinony vykazují vysokou antimykobakteriální aktivitu jak proti kmenům citlivým k současné léčbě, tak i proti kmenům rezistentním (MDR-TB a XDR-TB). Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymu DprE1 (dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa 2'-oxidáza), čímž dochází k zabránění vzniku arabinózy z ribózy a tím i k inhibici syntézy arabinanů - nezbytných složek buněčné stěny mykobakterií.[28] V preklinickém testování[7] se nachází hlavní zástupce benzothiazinonů - BTZ043, který vykazuje proti klinickému izolátu *M. tuberculosis* H37Rv výrazně vyšší antimykobakteriální aktivitu než isoniazid.[29]



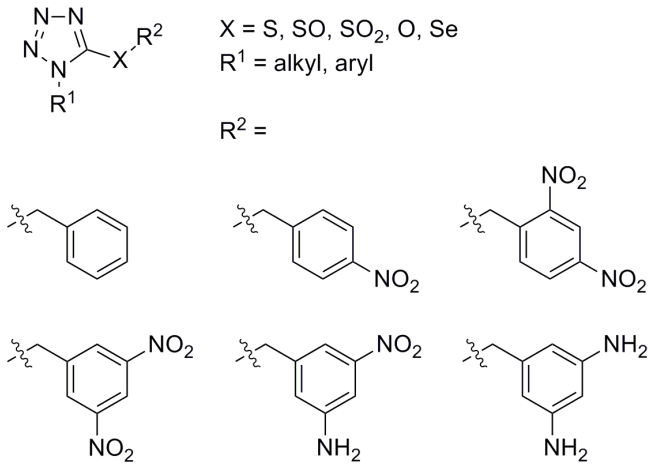
Obrázek 7: Struktura BTZ043

Vzhledem k rostoucímu výskytu lékově rezistentních forem TB je vývoj nových potenciálních antituberkulotik velice důležitý. Vývoj a zavádění nových antituberkulotik do praxe znesnadňuje důraz na bezpečnostní profil léčiv a také požadavky na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti: léčivo musí být tak rozpustné ve vodě, aby bylo schopné se pohybovat v krevním řečišti, avšak poté musí projít granulomem vytvořeným imunitními buňkami a následně lipidovou vrstvou buněčné stěny mykobakterií. Hledáním molekuly, která by splňovala tyto požadavky, se zabývá i tato práce.

4.4 Základní struktury látek připravených na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK a jejich základní charakteristika

V této práci jsme navázali na předchozí práci naší skupiny na katedře anorganické a organické chemie, která byla zaměřena na přípravu derivátů tetrazolu a oxadiazolu. Základní struktury dříve připravených a studovaných látek se staly předlohovými strukturami pro tuto práci.

4.4.1 1-substituované 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazoly a jejich izosterní analogy

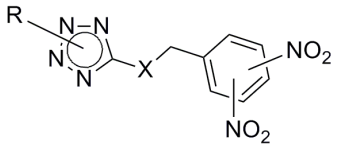


Obrázek 8: Základní struktury dříve připravených derivátů tetrazolu

Většina těchto připravených látek vykazovala v porovnání s isoniazidem vysokou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*. Pro zachování vysoké účinnosti je nutná přítomnost dvou nitroskupin vázaných na benzyl, přičemž nejlepších výsledků dosahovaly deriváty s nitroskupinami vázanými na benzyl v polohách 3 a 5. Naopak typ heteroatomu mezi dinitrobenzylem a tetrazolovým kruhem neměl zásadní vliv na antimykobakteriální aktivitu těchto sloučenin. Také substituent R^1 může být zaměněn bez výrazné ztráty antituberkulotických vlastností a navíc jej lze využít k optimalizaci farmakokinetických vlastností a poměru aktivita/toxicita. Dále bylo zjištěno, že tetrazolový kruh je důležitý strukturální prvek pro zachování vysoké antimykobakteriální aktivity *in vitro*.

Pro zjištění selektivity účinku studovaných sloučenin proti TB byla také hodnocena jejich aktivita proti osmi kmenům bakterií a osmi kmenům vláknitých hub. Jejich selektivní antimykobakteriální účinek byl potvrzen, jelikož tyto látky většinou nevykazovaly výraznou antibakteriální či antimykotickou aktivitu. Kromě toho byla také studována cytotoxicita vybraných sloučenin. Výsledky ukázaly, že 3,5-dinitrobenzylsulfanylové deriváty mají jen malý vliv na životaschopnost savčích buněk.[30]

4.4.2 2,5- a 1,5-disubstituované tetrazoly nesoucí dinitrobenzylsulfanylovou skupinu a jejich izosterní selenové analogy



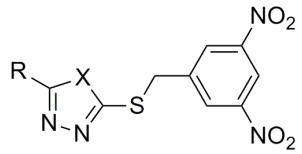
X = S, Se

Obrázek 9: Obecná struktura 2,5- a 1,5-disubstituovaných tetrazolů

5-substituované tetrazoly (5-ST) mohou existovat ve dvou tautomerních formách : 1*H*- a 2*H*-tautomery, a proto při substituci vzniká ve většině případů směs obou izomerů, pro které platí charakteristiky uvedené v kapitole 4.4.1. Dále bylo ale zapotřebí porovnat vlastnosti těchto 1- a 2-regioizomerů mezi sebou. Bylo zjištěno, že 2-regioizomery v porovnání s 1-regioizemry vykazují vyšší antimykobakteriální

aktivitu *in vitro* a zároveň nižší *in vitro* cytotoxicitu vůči liniím savčích buněk. U látek byla také hodnocena jejich mutagenní aktivita. Výsledky ukázaly, že tyto deriváty s 3,5-dinitrobenzylovou skupinou mutagenní aktivitu nevykazují.[31]

4.4.3 2,5-disubstituované 1,3,4-oxadiazoly a 1,3,4-thiadiazoly nesoucí 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinu



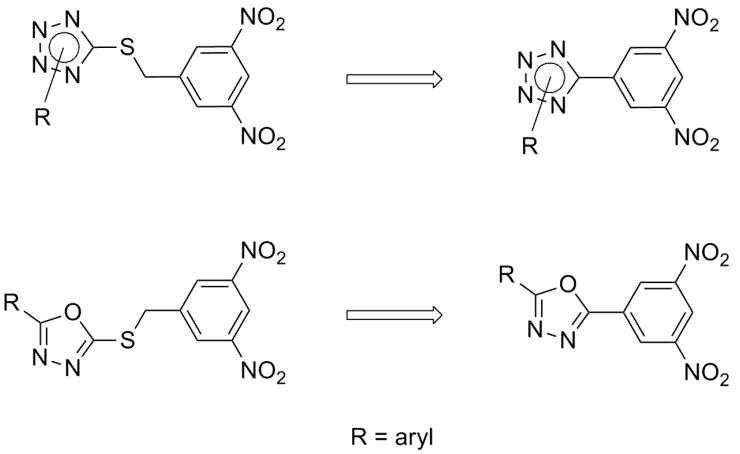
X = O, S
R = alkyl, aryl

Obrázek 10: Obecná struktura 2,5-disubstituovaných oxadiazolů a thiadiazolů

Dále se pracovníci katedry anorganické a organické chemie zaměřili na přípravu derivátů 1,3,4-oxadiazolu (popř. 1,3,4-thiadiazolu), které představují možné bioizosterní analogy 2,5-disubstituovaných tetrazolů. Většina připravených látek vykazovala vynikající antimykobakteriální aktivitu. Některé látky byly účinné i proti klinicky izolovaným MDR kmenům *M. tuberculosis*. Potvrdilo se, že pro zachování vysoké antimykobakteriální aktivity *in vitro* je důležitá přítomnost 3,5-dinitrobenzylsulfanylové skupiny. Naopak substituent R má zanedbatelný vliv na antimykobakteriální aktivitu, ale lze jej využít k ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností zkoumaných látek. Připravené deriváty oxadiazolu a thiadiazolu nevykazovaly stejně jako deriváty tetrazolu výrazné antibakteriální a antimykotické účinky, a tak byla potvrzena selektivita jejich antimykobakteriálního účinku. Testy cytotoxicity potvrdily, že deriváty s 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinou mají pouze minimální vliv na životaschopnost savčích buněk. Dále bylo zjištěno, že tato skupina není nositelem mutagenity. Hlavní nevýhodou připravených látek s 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinou je jejich nízká rozpustnost ve vodném prostředí a poměrně rychlá metabolická degradace.[32]

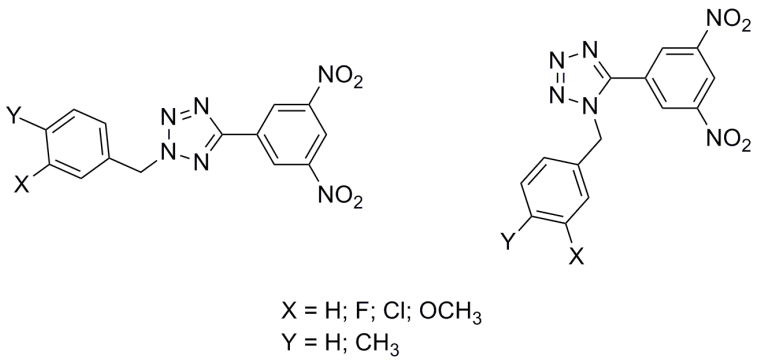
5. CÍL PRÁCE

Tato práce navazuje na předchozí práci naší skupiny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK, při které bylo zjištěno, že 2,5- a 1,5-disubstituované tetrazoly a 2,5-disubstituované 1,3,4-oxadiazoly, nesoucí 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinu, vykazují vysokou antimykobakteriální aktivitu.[30,31,32] Vzhledem ke známým a popsaným skutečnostem bylo rozhodnuto připravit deriváty bez methylsulfanylového spojovacího řetězce, na základě jejichž biologických vlastností bude možno stanovit základní vztah struktura/účinek (Obrázek 11).



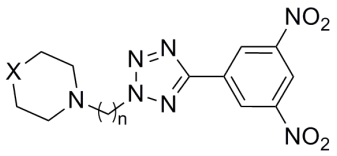
Obrázek 11: Odvození základní struktury připravovaných látek

Nejprve budou připraveny substituované 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazoly (Obrázek 12). U těchto regioizomerů bude hodnocena a porovnána jejich antimykobakteriální aktivita *in vitro*.



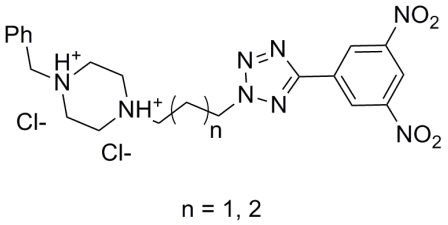
Obrázek 12: Obecná struktura připravovaných 2,5- a 1,5-disubstituovaných tetrazolů

Vzhledem k předpokládané velmi nízké rozpustnosti připravených látek ve vodě bylo dalším cílem připravit sloučeniny s vyšší rozpustností. V prvním kroku budou připraveny a otestovány deriváty tetrazolu nesoucí nasycený dusíkatý heterocyklus (Obrázek 13).



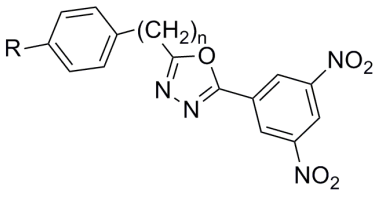
Obrázek 13: Obecný vzorec připravovaných derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem

V druhém kroku budou od vybraných derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterockylem připraveny jejich ve vodě rozpustné soli (Obrázek 14). Pro srovnání s jejich neprotonizovanou formou bude taktéž hodnocena antimykobakteriální aktivita *in vitro.*



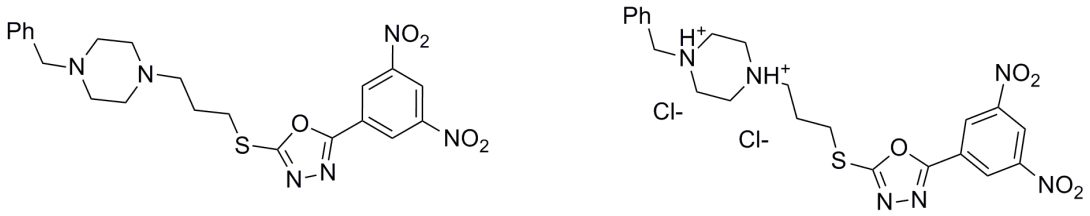
Obrázek 14: Struktura ve vodě rozpustných dihydrochloridů

Další část práce bude zaměřena na syntézu derivátů oxadiazolu (Obrázek 15), u kterých bude snaha zjistit, zda je i přes nepřítomnost síry zachována vysoká antimykobakteriální aktivita *in vitro*.



Obrázek 15: Obecný vzorec připravovaných derivátů oxadiazolu

Nakonec bude připraven derivát oxadiazolu se sírou ve spojovacím řetězci mezi oxadiazolem a nasyceným dusíkatým heterocyklem. Nasycený dusíkatý heterocyklus umožní přípravu ve vodě rozpustného dihydrochloridu. Obě látky budou otestovány na jejich antimykobateriální aktivitu *in vitro* (Obrázek 16).

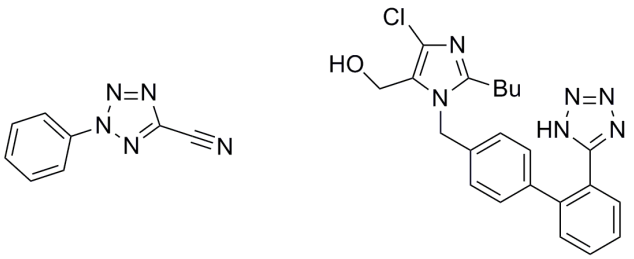


Obrázek 16: Struktura 2-((3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)sulfanyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolu a jeho dihydrochloridu

6. METODICKÁ ČÁST

6.1 Stručný přehled biologicky aktivních tetrazolů

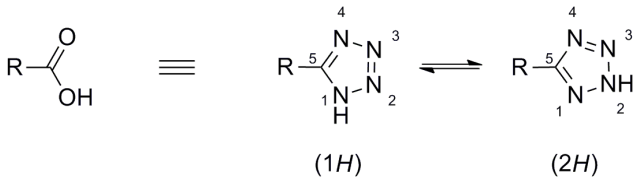
Za první sloučeninu obsahující tetrazolový kruh se považuje 2-fenyl-2*H*-tetrazol-5-karbonitril (Obrázek 17), který byl připraven a charakterizován v roce 1885.[33] Od té doby se tetrazoly začaly postupně objevovat ve všech oblastech organické chemie. Své uplatnění našly i ve farmaceutické chemii. Tetrazolový kruh lze najít ve skupině inhibitorů receptorů pro angiotenzin II (tzv. "sartany"), jejichž prvním reprezentativním zástupcem byl losartan (Obrázek 17).[34] Dalším používaným léčivem obsahujícím tetrazol ve své struktuře je tomelukast ze skupiny antileukotrienů.[35] Další biologicky aktivní látky obsahující tetrazolový kruh spadají například do těchto skupin: antibiotika, antimykotika, antidiabetika, inhibitory NO-syntázy, nesteroidní antiflogistika, antivirotika a látky ovlivňující glutamátové receptory.[36]



Obrázek 17: Struktura 2-fenyl-2H-tetrazol-5-karbonitrilu a losartanu

6.2 Chemické vlastnosti 5-substituovaných tetrazolů

Tetrazoly obsahují volnou vazbu N-H, která je zodpovědná za jejich kyselý charakter. Po deprotonizaci jsou schopné stabilizovat negativní náboj delokalizací elektronů v aromatickém kruhu. Jejich pK_a je velice podobné pK_a karboxylových kyselin a jsou považovány za relativně silné N-H kyseliny. Z toho také vyplývá, že tetrazoly jsou rozpustné ve vodných roztocích zásad. Vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem a prostorovému uspořádání se využívají jako metabolicky stabilní bioizosterní analogy karboxylových kyselin (Obrázek 18).



Obrázek 18: 5-ST jako bioizosterní náhrada karboxylových kyselin a jejich tautomery

5-ST existují ve dvou tautomerních formách : 1*H*- a 2*H*-tautomery (Obrázek 18). S tím také souvisí problém při substituci 5-ST, při které vzniká ve většině případů směs obou izomerů. Vzhledem k výraznější delokalizaci elektronů u 2*H*-tautomerní formy je tato forma stabilnější v plynném stavu, v roztocích je pak poměr tautomerů silně ovlivněn polaritou rozpouštědla.[37]

6.3 Syntéza 5-substituovaných tetrazolů

V roce 1958 Finnegan publikoval převratný způsob syntézy 5-ST využívající reakci nitrilu a anorganického azidu. Jak je uvedeno ve schématu níže (Schéma 1), reakce se účastnil azid sodný s chloridem amonným v prostředí *N*,*N*-dimethylformamidu (DMF).[38]

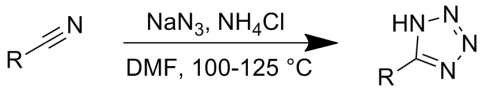


Schéma 1: Finneganova metoda přípravy 5-ST

Tento způsob přípravy přinesl zkrácení reakční doby, zvýšení výtěžků a stal se základem nových metod a modifikací přípravy 5-ST, které lze rozdělit do tří skupin:[39]

- reakce v kyselém prostředí nebo kysele katalyzované,
- reakce s využitím Lewisových kyselin,
- reakce s využitím azidů organokovových a organokřemičitých sloučenin.

6.3.1 Reakce v kyselém prostředí nebo kysele katalyzované

Do této skupiny lze zahrnout samotnou Finneganovu reakci, při které molekula azidu napadá atom uhlíku v molekule nitrilu. S největší pravděpodobností dochází nejdříve ke vzniku meziproduktu imidoylazidu, který následně cyklizuje a vzniká tak tetrazolový

kruh (Schéma 2).[38] Kladný parciální náboj na atomu uhlíku nitrilu je pro reakci velice důležitý. Elektronakceptorové substituenty nitrilu snižují aktivační energii a zvyšují tak reaktivitu nitrilů vůči azidům. Nevýhodou této metody přípravy je vznik toxického a výbušného azoimidu v reakční směsi.[39]

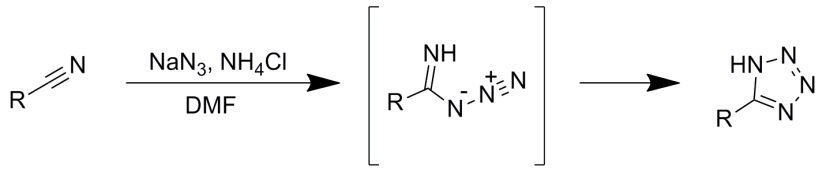


Schéma 2: Pravděpodobný mechanismus Finneganovy reakce

Významná modifikace Finneganovy metody přišla v roce 1998, kdy Koguro provedl reakci nitrilu s azidem sodným a triethylamoniumchloridem za použití toluenu jako rozpouštědla (Schéma 3).[40] Výhodou této modifikace je snadná izolace produktů extrakcí do vody nebo do vodných roztoků alkálií.[39]

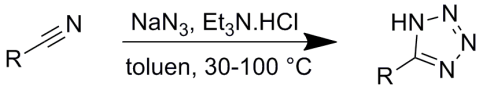


Schéma 3: Kogurova metoda přípravy 5-ST

Také Kogurova metoda byla modifikována a vylepšena například použitím mikrovlnné iradiace. Pro tento způsob přípravy bylo nutné nahradit toluen nitrobenzenem, který vykazuje vyšší dipólový moment, a proto je vhodným rozpouštědlem pro mikrovlnný ohřev (Schéma 4). Tato metoda byla vyvinuta již dříve naší pracovní skupinou[41] a spojuje výhody předešlých postupů, jako je: dobrá výtěžnost reakce, krátký reakční čas a jednoduchá izolace.

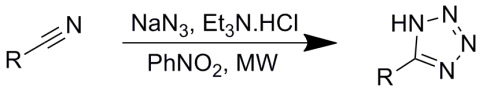


Schéma 4: Modifikace Kogurovy metody za použití mikrovlnné iradiace

6.3.2 Reakce s využitím Lewisových kyselin

Již v roce 1958 použil Finnegan ve své práci fluorid boritý jako Lewisovu kyselinu. Výsledky však byly horší než při použití chloridu amonného a Finnegan se dále Lewisovými kyselinami nezabýval.[38] Jako Lewisovu kyselinu lze použít také sloučeniny hliníku (Schéma 5). V obou případech je nutná práce v bezvodém prostředí.[39]

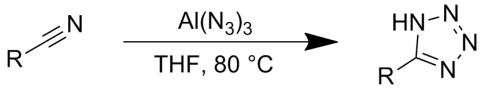


Schéma 5: Příprava 5-ST s využitím azidu hlinitého jako Lewisovy kyseliny

Průlomová byla práce Sharplesse[42], který zvolil jako Lewisovu kyselinu bromid zinečnatý a jako rozpouštědlo použil vodu (Schéma 6). Během reakce vznikají komplexní sloučeniny zinku s daným nitrilem, čímž dochází k výraznější polarizaci nitrilové skupiny a ke snížení aktivační energie. Výhodou této metody je jednoduchá izolace produktu okyselením reakční směsi a následnou filtrací. Nevýhodou je nutnost použití vysokého tlaku a vysokých teplot u méně reaktivních nitrilů.[39]

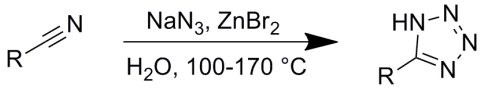


Schéma 6: Sharplessova metoda přípravy 5-ST

6.3.3 Reakce s využitím azidů organokovových a organokřemičitých sloučenin

V roce 1968 byla popsána schopnost trimethylsilylazidu reagovat s nitrily za vzniku 5-ST. Výhodou byla jeho stabilita, rozpustnost v organických rozpouštědlech a relativně vysoká teplota varu (95-96 °C). Nicméně buď tyto reakce vedly k malým výtěžkům nebo v případě méně reaktivních nitrilů reakce s trimethylsilylazidem prakticky neproběhly.[43]

Ve vyšších výtěžcích lze získat 5-ST využitím trialkylcínazidu (Schéma 7).[44,45] Výtěžnost těchto reakcí je zachována i v případě nitrilů se stericky náročnou substitucí. Nevýhodou je použití vysoce toxických reaktantů cínu, které je nutné z produktu důsledně odstranit.[39]

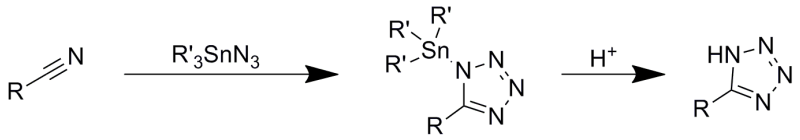


Schéma 7: Příprava 5-ST s využitím trialkylcínazidu

6.4 Funkcionalizace 5-substituovaných tetrazolů

Díky svým chemickým vlastnostem jsou 5-ST schopné reagovat s celou řadou elektrofilních sloučenin. Při substituci 5-ST vzniká téměř vždy směs 1- a 2-regioizomerů v různém poměru (Schéma 8). Tyto produkty je obvykle zapotřebí chromatograficky oddělit.

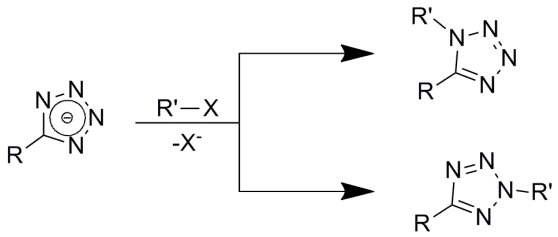
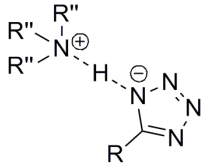


Schéma 8: Alkylace 5-ST

Poměr izomerů vzniklých během reakce záleží na reakční teplotě a vlastnostech substituentu tetrazolu v poloze 5. Zatímco vyšší teploty vedou ke zvýšenému výtěžku 1-regioizomerů, výraznější elektronakceptorové vlastnosti substituentu v poloze 5 zvyšují podíl 2-regioizomeru. Objemné substituenty řídí substituci do polohy 2 tetrazolového kruhu.[46]

Bylo zjištěno, že při substitučních reakcích prováděných v aprotických rozpouštědlech dochází ke vzniku amoniových solí 5-ST, ve kterých je atom dusíku v poloze 1 tetrazolového kruhu vázán vodíkovou vazbou k atomu dusíku použité báze (Obrázek 19).



Obrázek 19: Struktura amoniové soli 5-ST

Předpokládalo se, že existence takového komplexu orientuje substituci do polohy 2 tetrazolového kruhu a tuto hypotézu potvrdila i reakce triethylamoniové soli 5-ST s methylvinylketonem (Schéma 9).[47] Nicméně tato hypotéza byla později popřena, protože při substituci tetrazolu obsahujícího méně objemný substituent v poloze 5 docházelo ke vzniku obou regioizomerů ve srovnatelném poměru.[46]

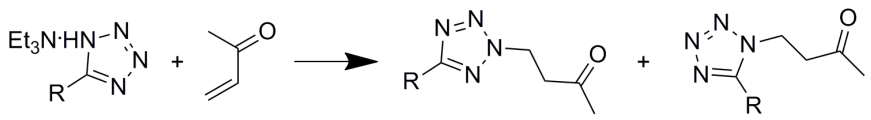


Schéma 9: Reakce triethylamoniové soli 5-ST s methylvinylketonem

Pro selektivní přípravu 2,5-disubstituovaných tetrazolů lze provést substituci 5-ST v silně kyselém prostředí. V tomto prostředí se totiž tetrazoly chovají jako báze a váží vodíkový proton na atom dusíku v poloze 4 za vzniku tetrazoliové soli. V této chvíli se může elektrofil vázat na atom dusíku tetrazolu v poloze 2 nebo 3, a tak vznikají 2,5-disubstituované tetrazoly.[48a-c] Konkrétním příkladem může být reakce 5-ST se sekundárními/terciárními alkoholy v kyselině sírové (Schéma 10).[49]

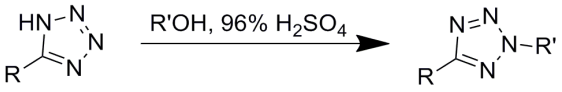


Schéma 10: Příprava 2,5-disubstituovaných tetrazolů v silně kyselém prostředí

Jelikož většina substitucí vede ke vzniku směsi 1- a 2-regioizomerů, je zapotřebí tyto produkty rozlišit. Pro to je možné využít nižší retence 2-regioizomerů na silikagelu. Tyto izomery tedy vykazují vyšší hodnoty R_f (retenční faktor), což také potvrzuje jejich nižší polaritu ve srovnání s 1-regioizomery. Jednotlivé regioizomery lze jednoznačně identifikovat pomocí ^{1}H a/nebo ^{13}C NMR spektroskopie. Tyto regioizomery se totiž liší hodnotami chemických posunů tetrazolového uhlíku a methylenové skupiny vázané na atom dusíku tetrazolu v poloze 1 nebo 2. Hodnoty chemických posunů u 2-regioizomerů odpovídají nižšímu poli (okolo 160 ppm pro uhlík tetrazolu) ve srovnání s 1-regioizomery (okolo 150 ppm pro uhlík tetrazolu).[31]

6.5 Příprava antituberkuloticky aktivních derivátů tetrazolu

6.5.1 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů

Látky tohoto typu budou připraveny substitucí 5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolu (**I**), který byl připraven na katedře anorganické a organické chemie v minulých letech. Jako alkylační činidlo bude použit různě substituovaný benzylchlorid (Schéma 11). Reakce budou probíhat v prostředí acetonitrilu za použití triethylaminu jako báze a reakční směs bude zahřívána k varu pod zpětným chladičem. Při substitučních reakcích budou využity kyselé vlastnosti tetrazolu a možnost vytvoření tetrazolátového aniontu, který je schopen reagovat s elektrofilními sloučeninami.

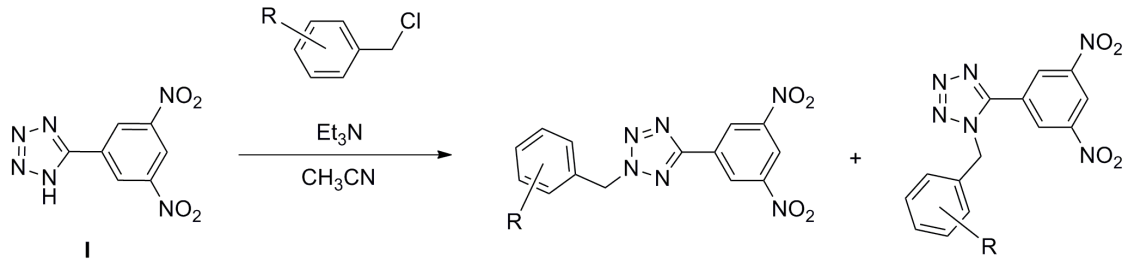


Schéma 11: Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazolů

6.5.2 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus

Vzhledem k chemickým vlastnostem 5-ST bude vhodné i v tomto případě využít substituční reakce. V první fázi bude provedena alkylace výchozího tetrazolu **I** podle následujícího obecného schématu (Schéma 12). Při alkylaci 1,2-dichlorethanem nebude použit acetonitril jako rozpouštědlo. V této reakční směsi bude 1,2-dichlorethan plnit funkci alkylačního činidla i rozpouštědla. Při této reakci hrozí spontánní eliminace na vinyl derivát.

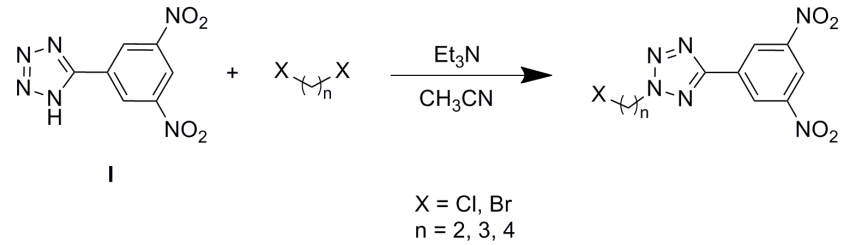


Schéma 12: Alkylace výchozího tetrazolu I

Takto připravená alkylační činidla bude možné dále použít k alkylaci různých nasycených dusíkatých heterocyklů (Schéma 13). Reakce proběhnou v prostředí acetonitrilu za použití K_2CO_3 nebo triethylaminu jako báze. Reakční směs bude zahřívána k varu. U chlorethyltetrazolu opět hrozí spontánní eliminace na vinyl derivát.

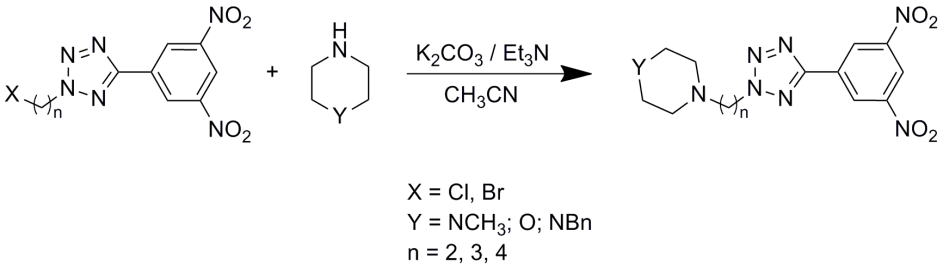


Schéma 13: Alkylace nasycených dusíkatých heterocyklů připravenými alkylačními činidly

6.5.3 Převedení připravených derivátů tetrazolu obsahujících *N*-benzylpiperazin na jejich dihydrochloridy

Dva deriváty tetrazolu obsahující *N*-benzylpiperazin a připravené podle postupu uvedeného v kapitole 6.5.2 budou převedeny na jejich ve vodě rozpustné dihydrochloridy (Schéma 14). Reakce bude provedena pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové, přičemž reakční směs bude za stálého míchání zahřívána až do úplného rozpuštění výchozí látky. Je předpokládán kvantitativní průběh reakce.

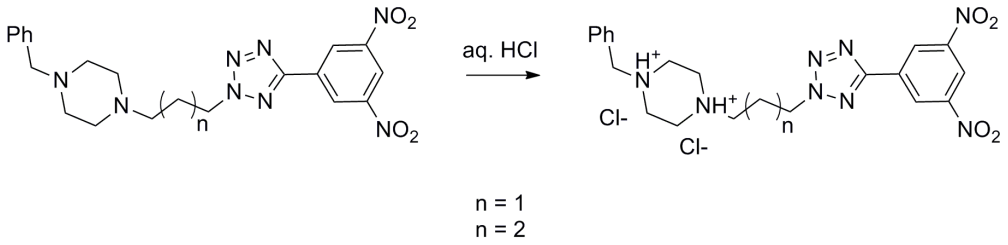
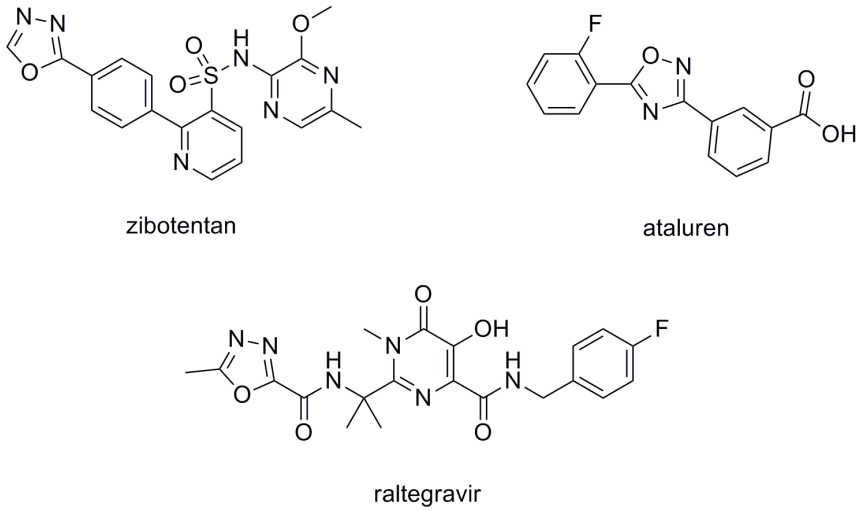


Schéma 14: Příprava dihydrochloridů derivátů tetrazolu

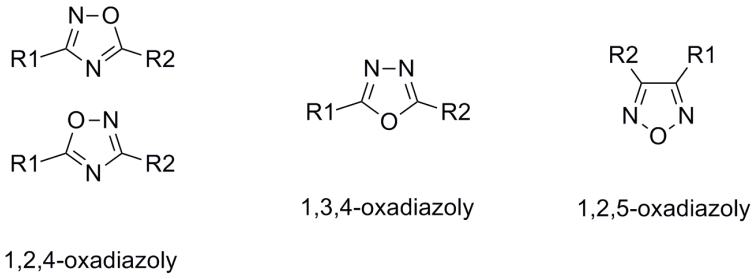
6.6 Charakteristika oxadiazolů

V posledních letech význam oxadiazolů ve farmaceutické chemii stále roste. Příkladem mohou být dvě látky ve fázi klinického testování - zibotentan pro léčbu karcinomu prostaty[50] a ataluren pro léčbu cystické fibrózy[51] (Obrázek 20). Na trh byl již uveden raltegravir.[52] Jedná se o antiretrovirální látku určenou k léčbě HIV infekce. Využitím oxadiazolů ve farmaceutické chemii se zabývá mnoho laboratoří po celém světě za účelem léčby různých onemocnění zahrnující diabetes[53], obezitu[54], zánětlivá[55] a infekční onemocnění[56].



Obrázek 20: Struktury látek obsahujících oxadiazolový kruh

Oxadiazolový kruh může existovat v několika různých regioizomerních formách: dva 1,2,4-regioizomery (v případě asymetrické substituce); 1,3,4-regioizomer a 1,2,5-regioizomer (Obrázek 21), přičemž poslední jmenovaný je méně častý. 1,3,4-regioizomer vykazuje ve srovnání s 1,2,4-regioizomery nižší lipofilitu, lepší rozpustnost ve vodě a příznivější ADME vlastnosti (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece).[57]



Obrázek 21: Možné regioizomerní formy oxadiazolového kruhu

6.7 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I

Ve snaze nalézt další antituberkuloticky aktivní látky bude další část práce zaměřena na 1,3,4-oxadiazol jako možnou bioizosterní náhradu za 2,5-disubstituovaný tetrazol. Jednou z možností jak připravit deriváty 1,3,4-oxadiazolu je přeměna tetrazolového cyklu na oxadiazolový dle následujícího schématu (Schéma 15).[58] Nejdříve bude nutné připravit halogenidy karboxylových kyselin reakcí chloridu thionylu s výchozími karboxylovými kyselinami. Následuje reakce připravených halogenidů s výchozím tetrazolem **I**, přičemž by mělo docházet k eliminaci dusíku a uzavření oxadiazolového kruhu. Tato reakce bude provedena v prostředí bezvodého toluenu za použití triethylaminu jako báze za podmínek konvenčního ohřevu pod zpětným chladičem.

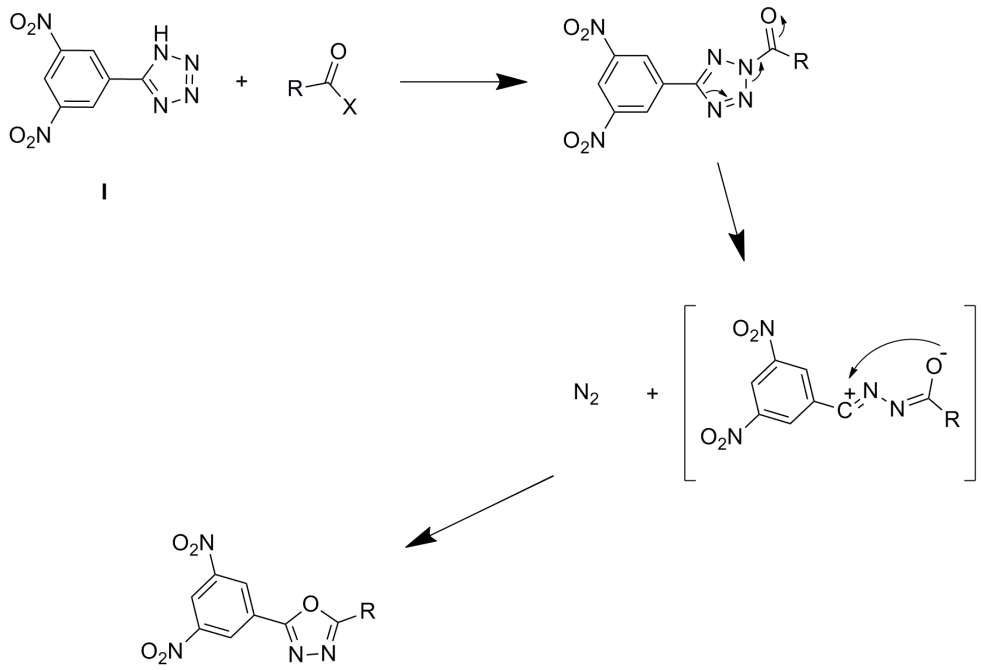
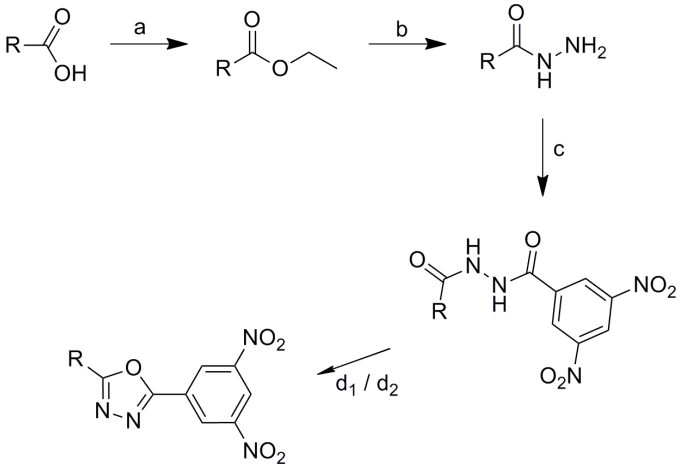


Schéma 15: Příprava oxadiazolového kruhu z tetrazolu

6.8 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu

Další možností jak připravit deriváty 1,3,4-oxadiazolu je použití čtyř po sobě následujících reakcí, jak je uvedeno v následujícím schématu (Schéma 16).



(a) H_2SO_4, EtOH; (b) monohydrát hydrazinu, EtOH;
(c) 3,5-dinitrobenzoylchlorid, *N*,*N*-diisopropylethylaminu (DIPEA)/triethylamin, CH_2Cl_2;
(d_1) $SOCl_2$, THF / (d_2) triethylamin, *p*-toluensulfonylchlorid, CH_2Cl_2

Schéma 16: Čtyřkroková syntéza derivátů 1,3,4-oxadiazolu

Prvním krokem syntézy bude esterifikace výchozích kyselin. Tyto kyseliny budou rozpuštěny v ethanolu, následně bude přidáno katalytické množství kyseliny sírové a reakční směs bude zahřívána k varu. Připravené estery reagují s monohydrátem hydrazinu v prostředí ethanolu za vzniku hydrazidů výchozích kyselin. Po izolaci hydrazidů bude provedena jejich acylace 3,5-dinitrobenzoylchloridem v prostředí dichlormethanu za použití *N*,*N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) nebo triethylaminu jako báze. Posledním krokem syntézy bude uzavření oxadiazolového kruhu. Pro přípravu těchto cílových produktů budou použity dvě metody. První metodou bude reakce v prostředí chloridu thionylu za použití tetrahydrofuranu (THF) jako rozpouštědla. Při druhém postupu budou zvoleny mírnější podmínky. Reakce bude prováděna v bezvodých podmínkách v prostředí triethylaminu a *p*-toluensulfonylchloridu za použití dichlormethanu jako rozpouštědla.

6.9 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b

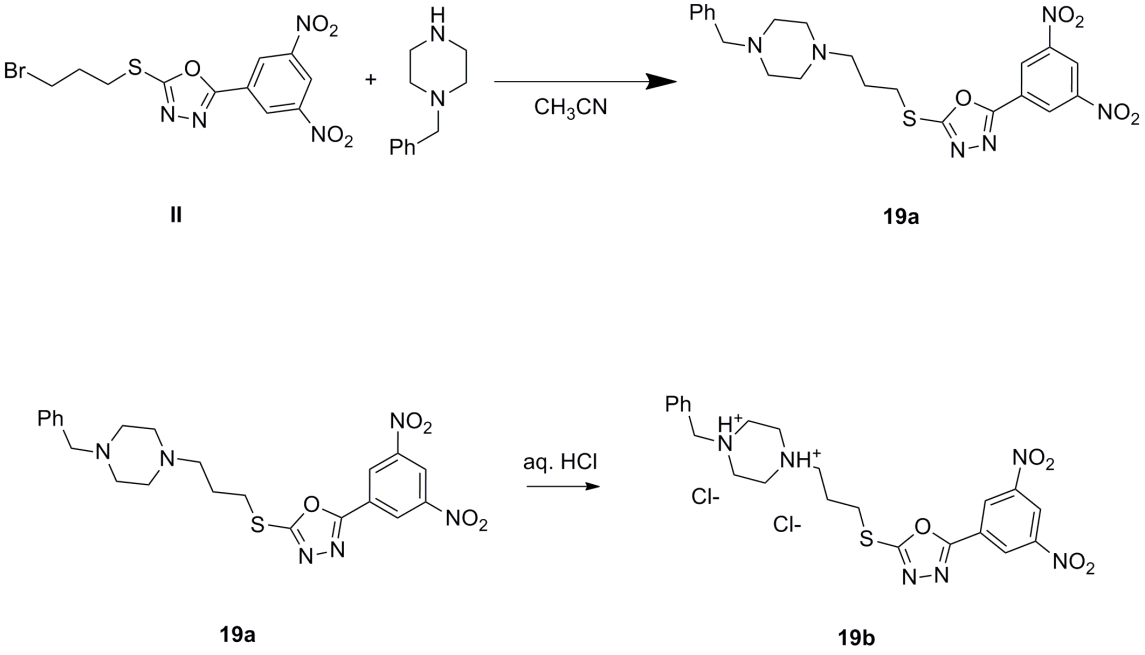


Schéma 17: Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b

Nakonec bude ještě připraven oxadiazolový derivát obsahující síru ve spojovacím řetězci mezi oxadiazolovým kruhem a nasyceným dusíkatým heterocyklem. K alkylaci nasyceného dusíkatého heterocyklu bude použito alkylační činidlo **II** připravené již dříve na katedře anorganické a organické chemie Janem Němečkem. Pro reakci budou použity 2 molární ekvivalenty *N*-benzylpiperazinu, přičemž druhý molární ekvivalent bude plnit funkci báze. Ve vodě rozpustný dihydrochlorid připraveného oxadiazolového derivátu bude připraven stejným postupem jako v případě přípravy dihydrochloridů tetrazolových derivátů (viz kapitola 6.5.3).

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie, které jsme použili při práci, byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) a nebyly dále čištěny. Rozpouštědla, která jsme použili při reakcích či jako součást mobilní fáze, byla zakoupena od společností Sigma-Aldrich a Lach-Ner Neratovice (Česká republika).

Výchozí 5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazol (**I**) a oxadiazolový derivát **II** byly připraveny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK v minulých letech.

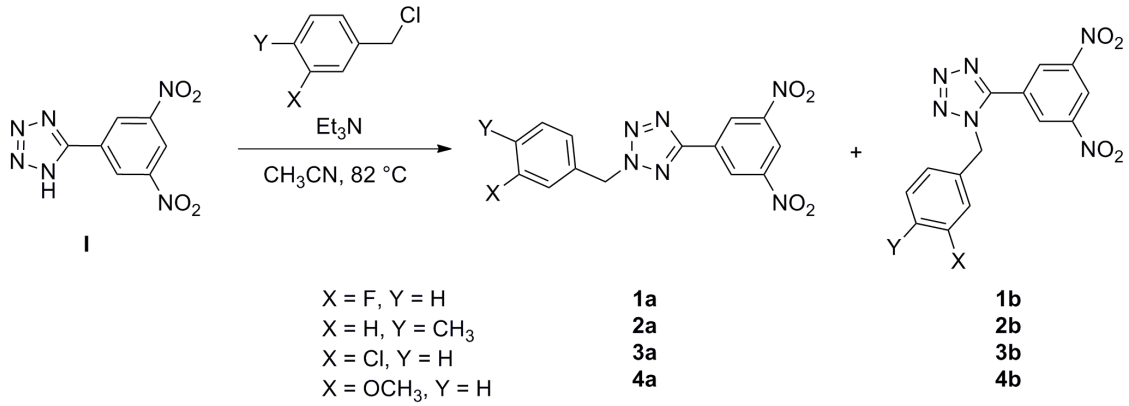
Při sloupcové chromatografii jsme jako stacionární fázi použili Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) společnosti Merck (Darmstadt, Germany). Pro tenkovrstvou chromatografii jsme použili desky od společnosti Merck (Silica gel 60 F254, aluminium back). Detekci jsme prováděli pod UV lampou a to při vlnové délce 254 nm.

U připravených látek byla měřena NMR spektra na přístroji Varian pracujícím při 500 MHz pro ^{1}H a 126 MHz pro ^{13}C (Varian, Palo Alto, CA, USA). Elementární analýza (C, H, N, S) byla provedena pomocí přístroje Fisons EA 1110 CHNS-O (Fisons Instruments S.p.A., Milán, Itálie).

Teploty tání připravených pevných látek jsme měřili pomocí Koflerova bloku.

7.2 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazolů

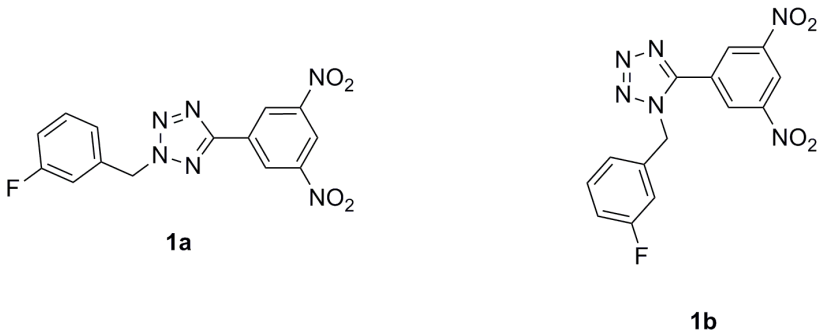
Obecné schéma:



Obecný postup přípravy látek série 1-4:

Výchozí tetrazol **I** jsme nechali reagovat se substituovaným benzylchloridem v prostředí acetonitrilu a triethylaminu. Reakční směs jsme zahřívali k varu pod zpětným chladičem po dobu 1,5-9 hodin a monitorovali pomocí TLC (tenkovrstvé chromatografie). Po ukončení reakce jsme odpařili acetonitril na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (40-50 ml). Ethyl-acetát jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Ethyl-acetátovou fázi jsme vysušili pomocí bezvodého síranu sodného a zahustili na vakuové odparce. Produkty jsme rozdělili pomocí sloupcové chromatografie.

7.2.1 Příprava 2- a 1-(3-fluorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 1a a 1b



Obrázek 22: Struktura připravovaných 3-fluorbenzyl derivátů 1a a 1b

Látky jsme připravili dle obecného postupu 7.2.:

- Použili jsme 0,5 g výchozího tetrazolu **I** (2,12 mmol);
  0,23 ml 3-fluorbenzylchloridu (1,91 mmol); 0,29 ml triethylaminu (2,12 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 1,5 hodiny.
- Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1).
- Produkty jsme získali pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 6:1).

*2-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(3-fluorbenzyl)-2H-tetrazol (**1a**)*

Vzhled: bílošedá krystalická látka

Molární hmotnost: 344,26 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,655 g

Praktický výtěžek: 0,168 g (**26 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,20 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 9,05 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,53 – 7,45 (m, 1H), 7,38 – 7,35 (m, 1H), 7,34 – 7,30 (m, 1H), 7,20 – 7,15 (m, 1H), 6,12 (s, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 163,66 (d, J = 245,3 Hz), 162,93, 150,14, 137,14 (d, J = 7,8 Hz), 131,85 (d, J = 8,3 Hz), 131,47, 127,06, 125,45 (d, J = 3,1 Hz), 120,66, 116,58 (d, J = 21,1 Hz), 116,32 (d, J = 22,7 Hz), 57,10

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 48,84; H, 2,64; N, 24,41
- nalezeno: C, 48,97; H, 2,80; N, 24,49

Teplota tání: 145-148 °C

*1-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(3-fluorbenzyl)-1H-tetrazol (**1b**)*

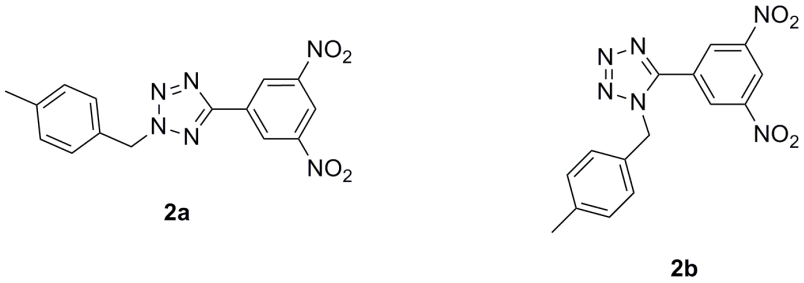
Vzhled: bílošedá krystalická látka

Molární hmotnost: 344,26 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,655 g

Praktický výtěžek: 0,024 g (**4 %**)

7.2.2 Příprava 2- a 1-(4-methylbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 2a a 2b



Obrázek 23: Struktura připravovaných 4-methylbenzyl derivátů 2a a 2b

Látky jsme připravili dle obecného postupu 7.2.:

- Pro reakci jsme použili 0,5 g výchozího tetrazolu **I** (2,12 mmol); 0,25 ml 4-methylbenzylchloridu (1,91 mmol); 0,29 ml triethylaminu (2,12 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 4 hodin.
- Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 6:1).
- Dva vznikající regioizomery jsme oddělili pomocí sloupcové chromatografie. Pro získání regioizomeru **2a** jsme použili mob. fázi: hexan : ethyl-acetát, 15:1 a poté jsme pro získání regioizomeru **2b** mobilní fázi změnili na: hexan : ethyl-acetát, 4:1.

*2-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(4-methylbenzyl)-2H-tetrazol (**2a**)*

Vzhled: bílošedá krystalická látka

Molární hmotnost: 340,30 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,649 g

Praktický výtěžek: 0,563 g (**87 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,18 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 9,04 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 7,23 (d, J = 8,1 Hz, 2H), 6,00 (s, 2H), 2,31 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 162,74, 150,09, 139,64, 131,62, 131,54, 130,38, 129,49, 126,96, 120,55, 57,67, 21,09

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 52,94; H, 3,55; N, 24,70
- nalezeno: C, 53,17; H, 3,19; N, 24,50

Teplota tání: 109-110 °C

*1-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-tetrazol (**2b**)*

Vzhled: bílá až nažloutlá krystalická látka

Molární hmotnost: 340,30 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,649 g

Praktický výtěžek: 0,066 g (**10 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,99 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,86 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,14 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,11 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 5,76 (s, 3H), 2,24 (s, 3H)

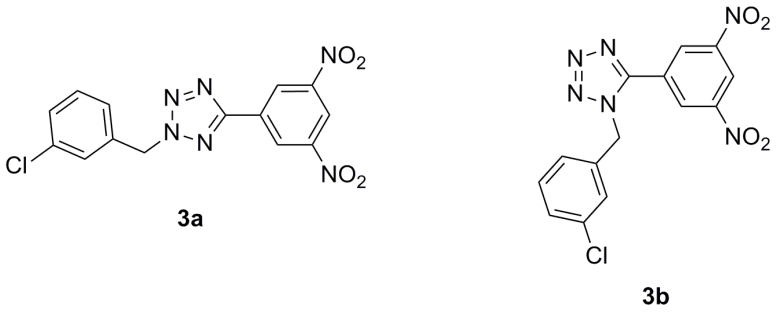
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 151,66, 148,54, 138,08, 131,08, 129,78, 129,57, 128,16, 126,77, 120,87, 51,29, 20,81

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 52,94; H, 3,55; N, 24,70
- nalezeno: C, 52,76; H, 3,38; N, 24,94

Teplota tání: 160-163 °C

7.2.3 Příprava 2- a 1-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 3a a 3b



Obrázek 24: Struktura připravovaných 3-chlorbenzyl derivátů 3a a 3b

Látky jsme připravili dle obecného postupu 7.2.:

- Použili jsme 0,2 g výchozího tetrazolu **I** (0,85 mmol);
  97 µl 3-chlorbenzylchloridu (0,76 mmol); 0,12 ml triethylaminu (0,85 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 9 hodin.
- V průběhu reakce jsme reakční směs monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 6:1).
- K izolaci obou regioizomerů **3a** a **3b** jsme využili sloupcovou chromatografii. Pro oddělení 2-regioizomeru **3a** jsme použili mob. fázi: hexan : ethyl-acetát, 8:1. Následně jsme pro izolaci 1-regioizomeru **3b** tuto mobilní fázi změnili na mobilní fázi: hexan : ethyl-acetát, 4:1.

*2-izomer: 2-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol (**3a**)*

Vzhled: bílošedá krystalická látka

Molární hmotnost: 360,71 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,275 g

Praktický výtěžek: 0,133 g (**48 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,19 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 9,05 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,60 – 7,59 (m, 1H), 7,51 – 7,42 (m, 3H), 6,11 (s, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 162,94, 150,13, 136,82, 135,06, 131,58, 131,44, 129,84, 129,49, 128,09, 127,06, 120,66, 57,03

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 46,62; H, 2,52; N, 23,30
- nalezeno: C, 46,92; H, 2,29; N, 23,15

Teplota tání: 140-143 °C

*1-izomer: 1-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazol (**3b**)*

Vzhled: bílošedá krystalická látka

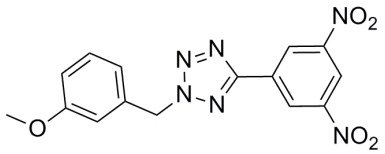
Molární hmotnost: 360,71 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,275 g

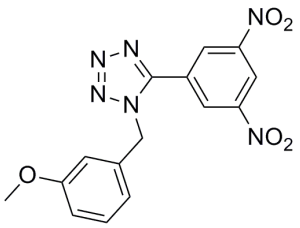
Praktický výtěžek: 0,012 g (**4 %**)

Teplota tání: 139-141 °C

7.2.4 Příprava 2- a 1-(3-methoxybenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů 4a a 4b



4a



4b

Obrázek 25: Struktura připravovaných 3-methoxybenzyl derivátů 4a a 4b

Látky jsme připravili dle obecného postupu 7.2.:

- Použili jsme 0,2 g výchozího tetrazolu **I** (0,85 mmol);
  0,11 ml 3-methoxybenzylchloridu (0,76 mmol); 0,12 ml triethylaminu (0,85 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 9 hodin.
- Reakci jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 6:1).
- 2 vznikající regioizomery jsme oddělili pomocí sloupcové chromatografie.
  Pro oddělení 2-regioizomeru **4a** jsme použili mob. fázi: hexan : ethyl-acetát, 8:1.
  Pro izolaci 1-regioizomeru **4b** jsme tuto mobilní fázi následně zaměnili za mobilní fázi: hexan : ethyl-acetát, 4:1.

*2-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(3-methoxybenzyl)-2H-tetrazol (**4a**)*

Vzhled: béžová krystalická látka

Molární hmotnost: 356,30 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,272 g

Praktický výtěžek: 0,183 g (**67 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,19 (d, J = 2,1 Hz, 2H), 9,05 (t, J = 2,1 Hz, 1H), 7,33 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 7,10 – 7,05 (m, 2H), 6,97 – 6,93 (m, 1H), 6,03 (s, 2H), 3,79 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 162,81, 161,01, 150,12, 135,98, 131,52, 130,95, 127,01, 121,41, 120,59, 115,15, 115,01, 57,74, 55,60

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 50,57; H, 3,39; N, 23,59
- nalezeno: C, 50,51; H, 3,52; N, 23,93

Teplota tání: 104-105 °C

*1-izomer: 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(3-methoxybenzyl)-1H-tetrazol (**4b**)*

Vzhled: béžová krystalická látka

Molární hmotnost: 356,30 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,272 g

Praktický výtěžek: 0,055 g (**20 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,99 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,86 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,28 – 7,19 (m, 1H), 6,88 (dd, *J* = 8,3, 2,6 Hz, 1H), 6,82 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 5,78 (s, 2H), 3,69 (s, 3H)

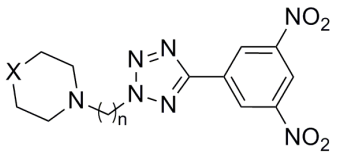
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 159,69, 151,76, 148,53, 135,52, 130,27, 129,80, 126,72, 120,89, 120,07, 114,25, 113,70, 55,26, 51,34

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 50,57; H, 3,39; N, 23,59
- nalezeno: látka nebyla získána v dostatečné čistotě

Teplota tání: 320 °C (rozklad)

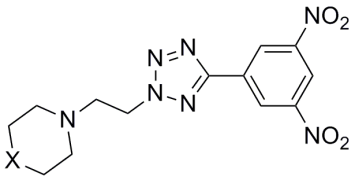
7.3 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus



X = NCH_3; O; NBn
n = 2, 3, 4

Obrázek 26: Obecný vzorec připravovaných derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem

7.3.1 Příprava derivátů s dvouuhlíkatým spojovacím řetězcem

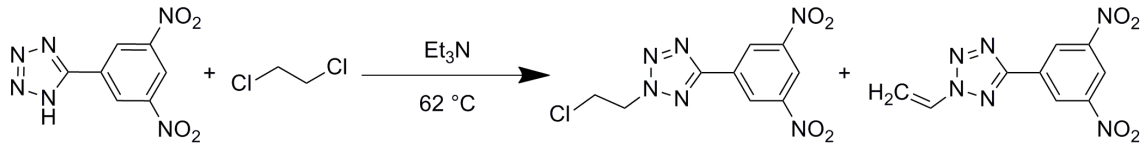


X = NCH_3 **6a**
X = O **6b**

Obrázek 27: Obecný vzorec připravovaných látek 6a a 6b

7.3.1.1 Příprava 2-(2-chlorethyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazolu (5a)

Obecné schéma:



I **5a** **5b**

Postup:

Výchozí tetrazol **I** (0,75 g; 3,18 mmol) jsme rozpustili v 15 ml 1,2-dichlorethanu, který v reakční směsi plnil funkci rozpouštědla a alkylačního činidla. Jako bázi jsme přidali triethylamin (0,44 ml; 3,18 mmol). Reakce probíhala 9,5 hodiny za stálého míchání pod zpětným chladičem na olejové lázni vytemperované na 62 °C. Pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1) jsme zjistili, že vznikaly 2 produkty - cílový produkt **5a** a vedlejší produkt **5b**. Po ukončení reakce jsme odpařili rozpouštědlo na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (60 ml), který jsme poté vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Nakonec jsme organickou fázi vysušili bezvodým síranem sodným a zahustili na vakuové odparce. Oba produkty jsme izolovali s využitím sloupcové chromatografie (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 6:1).

*Cílový produkt: 2-(2-chlorethyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol (**5a**)*

Vzhled: šedobílá krystalická látka

Molární hmotnost: 298,64 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,949 g

Praktický výtěžek: 0,362 g (**38 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,25 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 9,10 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,30 – 5,27 (m, 2H), 4,39 – 4,33 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 162,79, 150,19, 131,41, 127,04, 120,72, 56,00, 42,45

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 36,20; H, 2,36; N, 28,14
- nalezeno: C, 36,70; H, 2,23; N, 28,08

Teplota tání: 113-114 °C

*Vedlejší produkt: 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-vinyl-2H-tetrazol (**5b**)*

Vzhled: nažloutlá lesklá krystalická látka

Molární hmotnost: 278,23 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,884 g

Praktický výtěžek: 0,056 g (**6 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,09 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,97 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,99 (dd, *J* = 15,4, 8,7 Hz, 1H), 6,35 (dd, *J* = 15,4, 1,8 Hz, 1H), 5,68 (dd, *J* = 8,7, 1,8 Hz, 1H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161,31, 148,99, 130,39, 129,26, 126,52, 120,42, 111,18

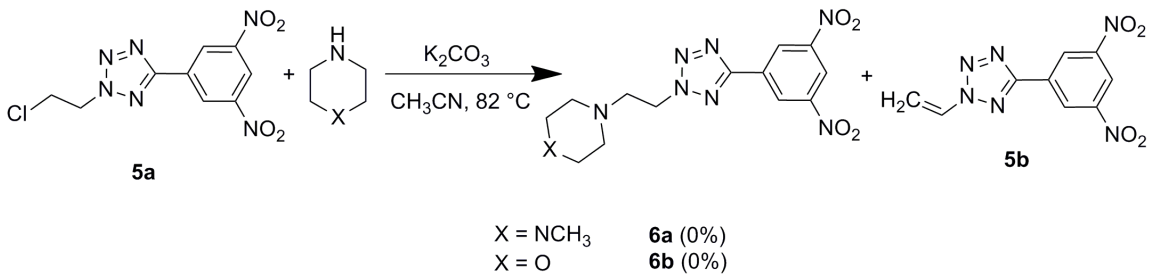
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 41,23; H, 2,31; N, 32,05
- nalezeno: C, 44,22; H, 2,82; N, 29,66

Teplota tání: 109 - 112 °C

7.3.1.2 Alkylace nasyceného dusíkatého heterocyklu připraveným chlorethyltetrazolem 5a

Obecné schéma:

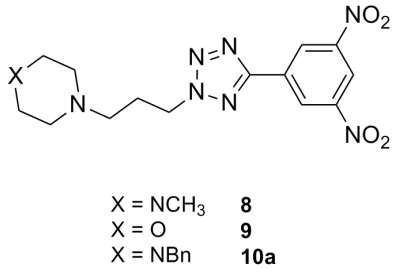


Postup:

Chlorethyltetrazol **5a** (0,1 g; 0,33 mmol) jsme nechali reagovat s *N*-methylpiperazinem (48 µl; 0,44 mmol) resp. morfolinem (38 µl; 0,44 mmol). Reakce probíhala v acetonitrilu za použití uhličitanu draselného (0,046 g; 0,33 mmol) jako báze. Reakční směs jsme zahřívali na 82 °C pod zpětným chladičem po dobu 4,5 hodiny a monitorovali jsme ji pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1). Reakci jsme ukončili, acetonitril jsme odpařili pomocí vakuové odparky a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (30 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 20 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Poté jsme tuto organickou fázi vysušili bezvodým síranem sodným a zahustili na vakuové odparce. Produkt jsme izolovali pomocí sloupcové chromatografie: u reakce s N-methylpiperazinem jsme použili mob. fázi: hexan : ethyl-acetát, 2:1 a u reakce s morfolinem mob. fázi: hexan : ethylacetát, 8:1. Srovnáním s chromatogramem vinylového derivátu **5b** a ověřením shody pomocí NMR jsme zjistili, že při reakci vzniká kvantitativně vinylový derivát **5b**.

Produkty *1-(2-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)ethyl)-4-methylpiperazin (**6a**)* a *4-(2-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)ethyl)morfolin (**6b**)* se nám tedy nepodařilo izolovat.

7.3.2 Příprava derivátů s tříuhlíkatým spojovacím řetězcem

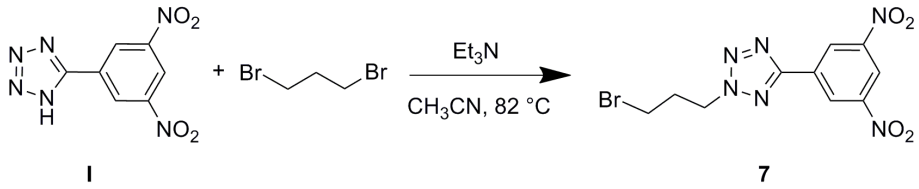


X = NCH_3 **8**
X = O **9**
X = NBn **10a**

Obrázek 28: Obecný vzorec připravovaných látek 8, 9 a 10a

7.3.2.1 Příprava 2-(3-brompropyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazolu (7)

Obecné schéma:



I **7**

Postup:

0,75 g výchozího tetrazolu **I** (3,18 mmol) jsme rozpustili v 15 ml acetonitrilu a přidali triethylamin (0,44 ml; 3,18 mmol). Nakonec jsme přidali alkylační činidlo 1,3-dibrompropan (1,62 ml; 15,88 mmol) a reakční směs jsme za neustálého míchání zahřívali pod zpětným chladičem na olejové lázni při teplotě 82 °C po dobu 5 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1). Reakci jsme ukončili, odpařili jsme acetonitril na vakuové odparce, odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (60 ml) a ten jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Poté jsme organickou fázi vysušili pomocí

bezvodého síranu sodného a ethyl-acetát jsme odpařili na vakuové odparce. Pro izolaci produktu **7** jsme použili sloupcovou chromatografii (mob. fáze: toluen).

*2-(3-brompropyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol (**7**)*

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Molární hmotnost: 357,12 g/mol

Teoretický výtěžek: 1,134 g

Praktický výtěžek: 0,680 g (**60 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,05 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,96 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 3,61 (t, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,60 – 2,54 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161,42, 149,00, 129,78, 126,27, 120,11, 51,96, 31,74, 30,83

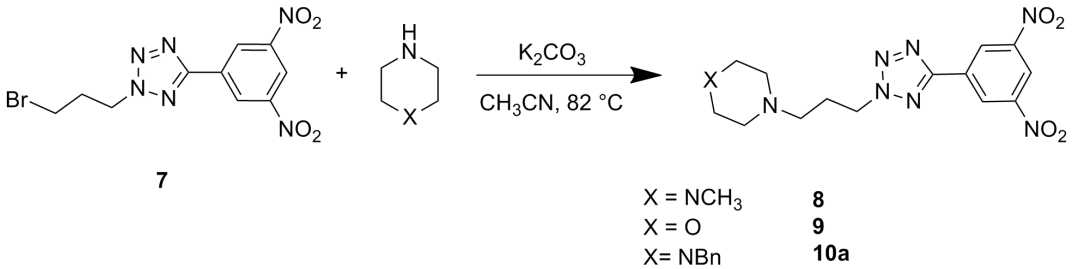
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 33,63; H, 2,54; N, 23,53
- nalezeno: C, 34,47; H, 2,54; N, 23,17

Teplota tání: 95-97 °C

7.3.2.2 Alkylace nasyceného dusíkatého heterocyklu připraveným brompropyltetrazolem 7

Obecné schéma:



7

X = NCH_3 **8**
X = O **9**
X= NBn **10a**

*a) Postup přípravy derivátů **8** a **9**:*

Nejprve jsme do baňky vložili K_2CO_3 (0,039 g; 0,28 mmol), ke kterému jsme přidali 10 ml acetonitrilu a 40 µl *N*-methylpiperazinu (0,36 mmol) resp. 31 µl morfolinu (0,36 mmol). Nakonec jsme přidali produkt předchozí reakce, brompropyltetrazol **7** (0,1 g; 0,28 mmol). Tuto reakční směs jsme zahřívali za stálého míchání na olejové lázni pod zpětným chladičem na teplotu 82 °C po dobu 5 hodin. Reakci jsme monitorovali pomocí TLC: pro derivát **8** (mob. fáze: chloroform : methanol, 17:1) a pro derivát **9** (mob. fáze: ethyl-acetát). Reakci jsme ukončili a reakční směs jsme přefiltrovali. Acetonitril jsme odpařili na vakuové odparce, odparek jsme rozpustili v mobilní fázi a produkty jsme izolovali pomocí sloupcové chromatografie: pro derivát **8** (mob. fáze: chloroform : methanol, 17:1) a pro derivát **9** (mob. fáze: ethyl-acetát).

*b) Derivát **10a** jsme připravili dle postupu a) s následujícími úpravami:*

- Vycházeli jsme z 1,834 g brompropyltetrazolu **7** (5,14 mmol), který jsme rozpustili ve 100 ml acetonitrilu. Při této reakci jsme jako bázi nepoužili K_2CO_3, ale přidali jsme 2 molární ekvivalenty *N*-benzylpiperazinu (1,810 g; 10,27 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali na teplotu 82 °C po dobu 13 hodin a monitorovali jsme ji pomocí TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 19:1).
- Reakční směs nebylo třeba filtrovat.
- Po odpaření acetonitrilu jsme odparek rozpustili v ethyl-acetátu (80 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem $KHCO_3$ (3 × 30 ml), vysušili ho pomocí bezvodého síranu sodného a tuto organickou fázi jsme zahustili na vakuové odparce.
- Cílový produkt **10a** se nám podařilo izolovat pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze: chloroform a v průběhu záměna za mob. fázi: chloroform : methanol, 19:1).

*1-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)propyl)-4-methylpiperazin (**8**)*

Vzhled: žlutá olejovitá látka

Molární hmotnost: 376,38 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,105 g

Praktický výtěžek: 0,098 g (**93 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,05 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,84 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,39 – 2,30 (m, 6H), 2,25 (br s, 4H), 2,22 – 2,12 (m, 2H), 2,11 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161,06, 148,89, 129,79, 126,04, 119,89, 54,74, 54,37, 52,56, 51,89, 45,73, 25,92

*4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)propyl)morfolin (**9**)*

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 363,33 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,102 g

Praktický výtěžek: 0,092 g (**90 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,06 (d, *J*= 2,1 Hz, 2H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,53 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H), 2,41 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,36 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H), 2,24 – 2,17 (m,2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 160,87, 148,80, 129,84, 125,82, 119,45, 66,01, 54,61, 53,00, 51,66, 25,41

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 46,28; H, 4,72; N, 26,99
- nalezeno: C, 46,71; H, 4,67; N, 25,53

Teplota tání: 129-133 °C

*1-benzyl-4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)propyl)piperazin (**10a**)*

Vzhled: nažloutlá olejovitá látka

Molární hmotnost: 452,48 g/mol

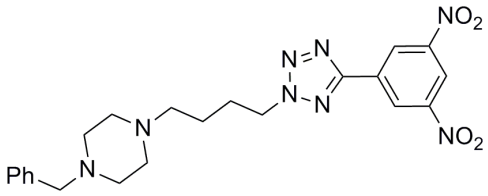
Teoretický výtěžek: 2,324 g

Praktický výtěžek: 1,773 g (**76 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,04 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,32 – 7,19 (m, 5H), 4,84 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,39 (s, 2H), 2,40 – 2,24 (m, 10H), 2,19 – 2,12 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161,18, 148,99, 138,32, 129,90, 128,91, 128,25, 126,99, 126,17, 120,02, 79,33, 62,24, 54,53, 52,81, 52,01, 26,04

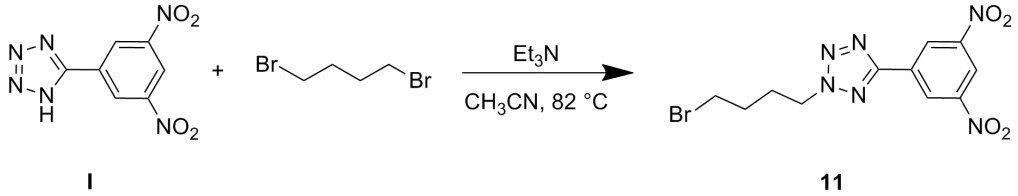
7.3.3 Příprava derivátů se čtyřuhlíkatým spojovacím řetězcem



Obrázek 29: Struktura připravované látky 12a

7.3.3.1 Příprava 2-(4-brombutyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazolu (11)

Obecné schéma:



I **11**

Postup:

Navážili jsme 0,75 g výchozího tetrazolu **I** (3,18 mmol) a rozpustili ho v 15 ml acetonitrilu. Poté jsme přidali 0,44 ml triethylaminu (3,18 mmol) a 1,87 ml 1,4-dibrombutanu (15,88 mmol). Tuto reakční směs jsme zahřívali za stálého míchání na olejové lázni pod zpětným chladičem na teplotu 82 °C po dobu 5 hodin. Reakci jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1). Po ukončení reakce jsme odpařili acetonitril na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (60 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Organickou fázi jsme vysušili pomocí bezvodého síranu sodného a ethyl-acetát jsme odpařili na vakuové odparce. Zbytku alkylačního činidla 1,4-dibrombutanu jsme se zbavili rozmícháním odparku v 30 ml hexanu (produkt **11** se v hexanu nerozpouští) a následnou filtrací. Získané krystaly jsme vysušili ve vakuu.

*2-(4-brombutyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol (**11**)*

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Molární hmotnost: 371,15 g/mol

Teoretický výtěžek: 1,179 g

Praktický výtěžek: 0,740 g (**63 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,05 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,89 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,60 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 2,21 – 2,06 (m, 2H), 1,96 – 1,83 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161,35, 148,99, 129,78, 126,24, 120,08, 52,67, 34,22, 29,24, 27,60

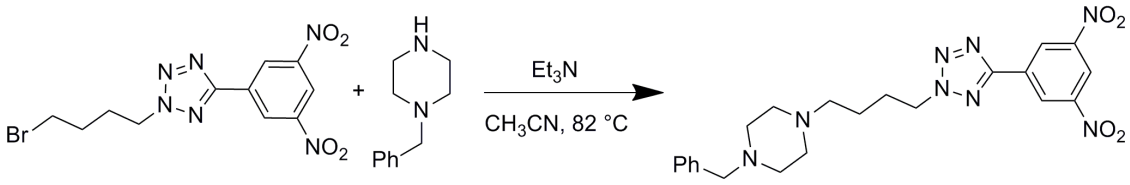
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 35,60; H, 2,99; N, 22,64
- nalezeno: C, 36,89; H, 2,81; N, 24,14

Teplota tání: 75-77 °C

7.3.3.2 Alkylace nasyceného dusíkatého heterocyklu připraveným brombutyltetrazolem 11

Obecné schéma:



11 **12a**

Postup:

Produkt předchozí reakce, brombutyltetrazol **11** (0,450 g; 1,21 mmol), jsme nechali reagovat s *N*-benzylpiperazinem (0,256 g; 1,45 mmol) v přítomnosti acetonitrilu a triethylaminu (0,17 ml; 1,21 mmol). Reakční směs jsme zahřívali na 82 °C po dobu 24 hodin. Reakci jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1 + 1 % Et_3N). Po ukončení reakce jsme acetonitril odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (60 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem K_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Ethyl-acetát jsme poté vysušili

bezvodým síranem sodným a tuto organickou fázi jsme zahustili na vakuové odparce. Produkt **12a** jsme izolovali sloupcovou chromatografií (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 1:1 + 1 % Et_3N).

*1-benzyl-4-(4-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)butyl)piperazin (**12a**)*

Vzhled: žlutohnědá olejovitá látka

Molární hmotnost: 466,49 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,566 g

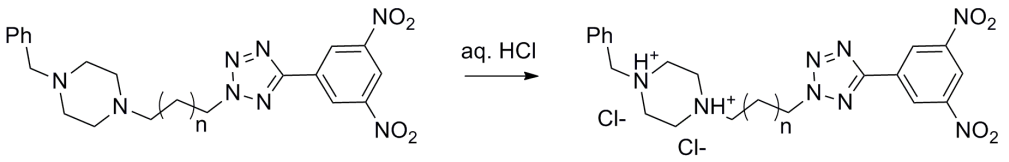
Praktický výtěžek: 0,430 g (**76 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9,29 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 9,10 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,33 – 7,19 (m, 5H), 4,77 (t, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,49 (s, 2H), 2,60 – 2,35 (m, 10H), 2,19 – 2,10 (m, 2H), 1,63 – 1,53 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 161,46, 148,93, 137,91, 131,05, 129,08, 128,08, 126,92, 126,47, 119,61, 62,93, 57,37, 53,61, 53,09, 52,93, 27,27, 23,50

7.3.4 Příprava dihydrochloridů látek 10a a 12a

Obecné schéma:



10a n = 1 **10b**
12a n = 2 **12b**

Postup:

Připravenou látku **10a** (1,773 g) resp. **12a** (0,170 g) jsme smísili s 1M kyselinou chlorovodíkovou (20-50 ml) a směs jsme za stálého míchání zahřívali do úplného rozpuštění látky. Dle potřeby jsme ještě přidávali vodu. Nakonec jsme roztok odpařili na vakuové odparce a krystaly vysušili ve vakuu.

*1-benzyl-4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)propyl)piperazin dihydrochlorid (**10b**)*

Vzhled: bíložlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 525,39 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,059 g

Praktický výtěžek: 1,976 g (**96 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ 9,15 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 9,11 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,47 – 7,37 (m, 5H), 4,86 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 4,35 (s, 2H), 3,52 (s, 8H), 3,34 – 3,28 (m, 2H), 2,55 – 2,45 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ 161,98, 148,81, 131,12, 130,53, 129,59, 129,38, 127,59, 127,07, 120,59, 60,47, 53,73, 50,53, 48,88, 48,32, 23,27

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 48,01; H, 4,99; N, 21,33
- nalezeno: C, 49,38; H, 5,23; N, 18,85

Teplota tání: 240 °C (rozklad)

*1-benzyl-4-(4-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2H-tetrazol-2-yl)butyl)piperazin dihydrochlorid (**12b**)*

Vzhled: bíložlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 539,42 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,197 g

Praktický výtěžek: 0,187 g (**95 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,06 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 8,95 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 5,8 Hz, 2H), 7,48 – 7,40 (m, 3H), 4,88 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H), 4,34 (br s, 2H), 3,79 – 3,01 (m, 10H), 2,15 – 2,05 (m, 2H), 1,83 – 7,73(m, 2H)

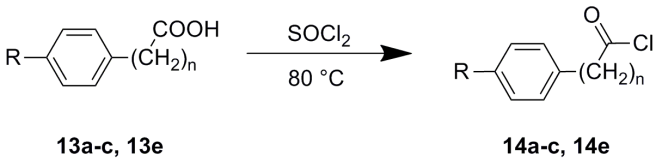
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 48,99; H, 5,23; N, 20,77
- nalezeno: C, 47,57; H, 5,25; N, 20,33

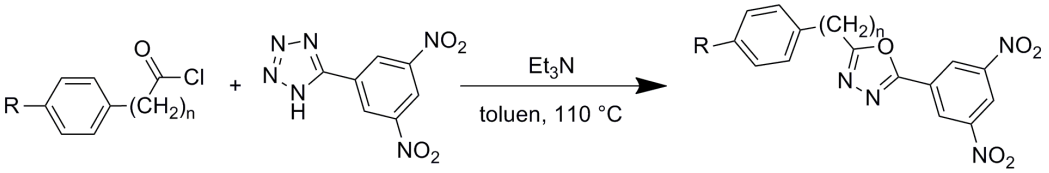
Teplota tání: 248-251 °C

7.4 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I

Obecné schéma:



13a-c, 13e **14a-c, 14e**



14a-c, 14e **I**

R = OCH_3	n = 2	**15a** (15%)
R = Cl	n = 2	**15b** (0%)
R = H	n = 1	**15c** (5%)
R = OCH_3	n = 1	**15e** (0%)

*Postup přípravy derivátu **15a**:*

a) *Příprava chloridu kyseliny:*

Navážili jsme 0,2 g 3-(4-methoxyfenyl)propionové kyseliny (1,11 mmol) (**13a**), kterou jsme rozpustili v 10 ml $SOCl_2$. Tuto reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 4 hodin. Po ukončení reakce jsme odpařili $SOCl_2$ destilací za sníženého tlaku. Zbytku $SOCl_2$ jsme se zbavili rozpuštěním odparku v hexanu (2 × 10 ml) a následným odpařením rozpouštědla na vakuové odparce.

b) *Příprava cílového produktu **15a**:*

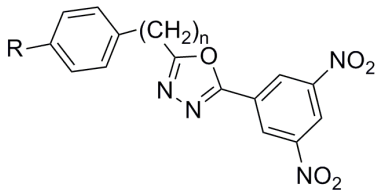
Připravený chlorid 3-(4-methoxyfenyl)propionové kyseliny (**14a**) jsme ihned podrobili další reakci: odparek jsme rozpustili ve 20 ml bezvodého toluenu a přidali jsme 0,288 g tetrazolu **I** (1,22 mmol) a triethylamin jako bázi (0,15 ml; 1,11 mmol). Takto připravenou reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 15 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 3:1). Reakci jsme ukončili a bezvodý toluen jsme odpařili na vakuové odparce. Odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (40 ml),

který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Organickou fázi jsme vysušili bezvodým síranem sodným a ethyl-acetát jsme odpařili na vakuové odparce. Cílový produkt **15a** jsme se snažili izolovat sloupcovou chromatografií (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 5:1). Při reakci ale vznikala těžko dělitelná směs látek, a tak se nám podařilo izolovat pouze 15 % teoretického výtěžku cílového produktu **15a**.

Stejným způsobem jsme připravovali deriváty **15b**, **15c** a **15e**. Cílový produkt **15c** se nám podařilo izolovat v 5% výtěžku. Produkty **15b** a **15e** se nám nepodařilo izolovat.

Charakteristika produktů **15a** a **15c**: viz kapitola 7.5.4

7.5 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu

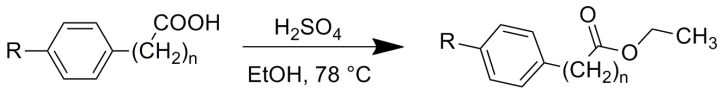


R = OCH_3	n = 2	**15a**
R = Cl	n = 2	**15b**
R = H	n = 1	**15c**
R = CH_3	n = 2	**15d**

Obrázek 30: Obecný vzorec připravovaných látek 15a-d

7.5.1 Příprava esterů 16a-16d

Obecné schéma:



13a	$R = OCH_3$	n = 2	**16a**
13b	R = Cl	n = 2	**16b**
13c	R = H	n = 1	**16c**
13d	$R = CH_3$	n = 2	**16d**

Postup:

Navážili jsme 2 g výchozí kyseliny **13a-d**, kterou jsme rozpustili ve 20 ml ethanolu a nakonec jsme přidali katalytické množství kyseliny sírové. Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 20 hodin. Reakci jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1). Po ukončení reakce jsme ethanol odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (80 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 30 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 25 ml). Organickou fázi jsme vysušili pomocí bezvodého síranu sodného a ethyl-acetát jsme odpařili na vakuové odparce. Pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1) a NMR spektroskopie jsme ověřili identitu a čistotu produktů **16a-d**.

*ethylester 3-(4-methoxyfenyl)propanové kyseliny (**16a**)*

Vzhled: nažloutlá olejovitá látka

Molární hmotnost: 208,26 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,311 g

Praktický výtěžek: 2,189 g (**95 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,15 – 7,11 (m, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 4,13 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 2,90 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 2,62 – 2,57 (m, 2H), 1,25 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H)

*ethylester 3-(4-chlorfenyl)propanové kyseliny (**16b**)*

Vzhled: šedobílá olejovitá látka

Molární hmotnost: 212,67 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,304 g

Praktický výtěžek: 2,163 g (**94 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,26 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,16 – 7,12 (m, 2H), 4,13 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,93 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,64 – 2,57 (m, 2H), 1,24 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H)

*ethylester 2-fenyloctové kyseliny (**16c**)*

Vzhled: nažloutlá olejovitá látka

Molární hmotnost: 164,20 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,411 g

Praktický výtěžek: 1,945 g (**81 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,37 – 7,26 (m, 5H), 4,17 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 3,63 (s, 2H), 1,27 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 171,57, 134,12, 129,19, 128,50, 126,99, 60,80, 41,39, 14,13

*ethylester 3-(4-methylfenyl)propanové kyseliny (**16d**)*

Vzhled: nažloutlá olejovitá látka

Molární hmotnost: 192,26 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,342 g

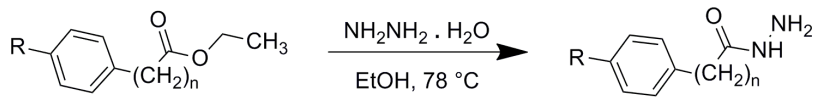
Praktický výtěžek: 2,221 g (**95 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7,12 (s, 4H), 4,15 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,95 – 2,91 (m, 2H), 2,64 – 2,60 (m, 2H), 2,34 (s, 3H), 1,26 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 172,93, 137,45, 135,62, 129,08, 128,10, 60,32, 36,05, 30,50, 20,95, 14,17

7.5.2 Příprava hydrazidů 17a-17d

Obecné schéma:



16a-d

R = OCH_3	n = 2	**17a**
R = Cl	n = 2	**17b**
R = H	n = 1	**17c**
R = CH_3	n = 2	**17d**

*a) Postup přípravy derivátu **17a**:*

Připravený ester **16a** (2,189 g; 10,51 mmol) jsme rozpustili ve 20 ml ethanolu a přidali 1,28 ml 80% monohydrátu hydrazinu (21,02 mmol). Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 19 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1). Po ukončení reakce jsme ethanol odpařili na vakuové odparce. Produkt jsme čistili rekrystalizací ze směsi ethanol/voda. Krystalizaci jsme podpořili vložením baňky se směsí do lednice na 3 hodiny a nakonec jsme vyloučené krystaly odsáli. Při kontrolním TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1) jsme zjistili, že produkt **17a** je znečištěn výchozím esterem **16a**. Pro vyčištění hydrazidu jsme krystaly (0,907 g; 4,67 mmol) rozpustili v tetrahydrofuranu (70 ml) a poté jsme přidali 2,33 ml 2M roztoku kyseliny chlorovodíkové v etheru (4,67 mmol). Vyloučené krystaly jsme odfiltrovali. Ke krystalům jsme přidali roztok uhličitanu draselného, který jsme připravili rozpuštěním 0,645 g K_2CO_3 (4,67 mmol) ve 2 ml vody. Poté jsme krystaly produktu **17a** odfiltrovali a vysušili ve vakuu.

*b) Derivát **17b** jsme připravili dle postupu a):*

- Při reakci jsme použili 2,163 g připraveného esteru **16b** (10,17 mmol) a 1,24 ml 80% monohydrátu hydrazinu (20,34 mmol).
- Produkt **17b** byl rovněž znečištěný výchozím esterem **16b**. Pro vyčištění 1,197 g krystalů cílového produktu (6,03 mmol) jsme použili 3,01 ml 2M

roztoku kyseliny chlorovodíkové v etheru (6,03 mmol) a 0,833 g K_2CO_3 (6,03 mmol).

*c) Derivát **17c** jsme připravili dle postupu a) s následujícími úpravami:*

- Při reakci jsme použili 1,945 g připraveného esteru **16c** (11,85 mmol) a 3,60 ml 80% monohydrátu hydrazinu (59,23 mmol).
- Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 24 hodin.
- Produkt jsme čistili rekrystalizací ze směsi ethanol/voda. Vyloučené krystaly jsme odsáli. Pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1) a NMR spektroskopie jsme ověřili čistotu cílového produktu **17c** - na rozdíl od produktů **17a** a **17b** jsme nemuseli produkt **17c** dále čistit.

*d) Postup přípravy derivátu **17d**:*

Připravený ester **16d** (2,200 g; 11,44 mmol) jsme rozpustili ve 20 ml ethanolu a přidali 2,83 ml 80% monohydrátu hydrazinu (57,21 mmol). Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 24 hodin. Průběh reakce a přítomnost výchozího esteru jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 4:1). Po ukončení reakce jsme ethanol odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozsuspendovali v diethyletheru, ve kterém je monohydrát hydrazinu rozpustný, avšak cílový produkt **17d** nikoliv. Krystaly jsme odfiltrovali a vysušili ve vakuu.

*hydrazid 3-(4-methoxyfenyl)propanové kyseliny (**17a**)*

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 194,23 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,042 g

Praktický výtěžek: 0,660 g (**32 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,11 (s, 1H), 7,09 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 6,82 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 4,64 (s, 2H), 3,70 (s, 3H), 2,73 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 2,29 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170,98, 157,69, 133,21, 129,32, 113,87, 55,15, 35,62, 30,32

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 61,84; H, 7,27; N, 14,42
- nalezeno: C, 60,70; H, 6,96; N, 13,94

Teplota tání: 123-126 °C

*hydrazid 3-(4-chlorfenyl)propanové kyseliny (**17b**)*

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 198,65 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,020 g

Praktický výtěžek: 0,922 g (**46 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,96 (s, 1H), 7,31 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 4,15 (s, 2H), 2,79 (t, *J* = 7,7 Hz, 2H), 2,34 – 2,27 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170,71, 140,40, 130,69, 130,30, 128,35, 35,00, 30,43

Teplota tání: 113-116 °C

*hydrazid 2-fenyloctové kyseliny (**17c**)*

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 150,18 g/mol

Teoretický výtěžek: 1,779 g

Praktický výtěžek: 0,895 g (**50 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9,21 (s, 1H), 7,30 – 7,18 (m, 5H), 4,18 (s, 2H), 3,73 (s, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 169,70, 136,44, 129,09, 128,33, 126,50

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 63,98; H, 6,71; N, 18,65
- nalezeno: C, 64,27; H, 6,52; N, 18,70

Teplota tání: 113-115 °C

*hydrazid 3-(4-methylfenyl)propanové kyseliny (**17d**)*

Vzhled: bílá krystalická látka

Molární hmotnost: 178,24 g/mol

Teoretický výtěžek: 2,040 g

Praktický výtěžek: 1,569 g (**77 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,94 (s, 1H), 7,06 (s, 4H), 4,19 (s, 2H), 2,77 – 2,72 (m, 2H), 2,30 – 2,26 (m, 2H), 2,24 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 170,96, 138,26, 134,93, 129,01, 128,22, 128,21, 35,38, 30,78, 20,79

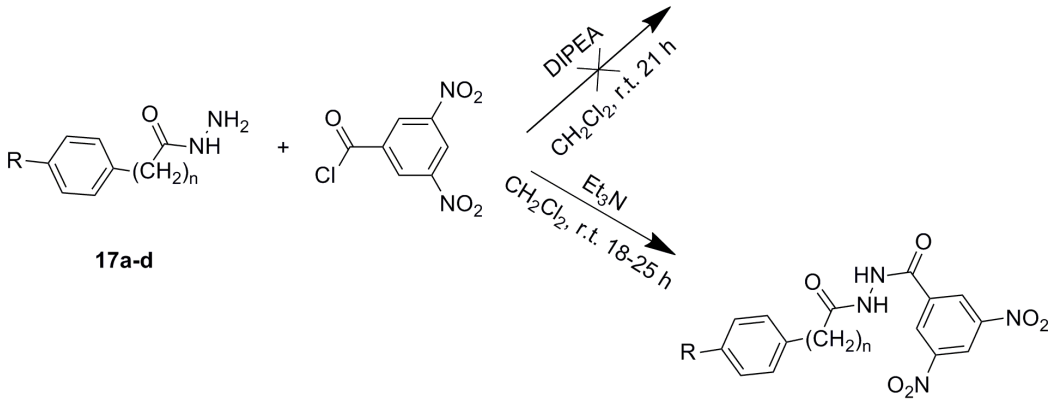
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 67,39; H, 7,92; N, 15,72
- nalezeno: C, 67,09; H, 7,83; N, 15,49

Teplota tání: 122-124 °C

7.5.3 Acylace připravených hydrazidů 3,5-dinitrobenzoylchloridem

Obecné schéma:



R = OCH_3	n = 2	**18a**
R = Cl	n = 2	**18b**
R = H	n = 1	**18c**
R = CH_3	n = 2	**18d**

*a) Postup přípravy cílových produktů **18a-d** za použití N,N-diisopropylethylaminu jako báze:*

1) *Příprava cílového produktu **18a**:*

   Připravený hydrazid **17a** (0,5 g; 2,57 mmol) jsme nechali reagovat s 0,653 g 3,5-dinitrobenzoylchloridu (2,83 mmol). Reakce probíhala v dichlormethanu za použití *N,N*-diisopropylethylaminu (0,49 ml; 2,83 mmol) jako báze. Reakci jsme prováděli za laboratorní teploty a stálého míchání po dobu 21 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 50:1 + 1 % Et_3N). Po ukončení reakce jsme dichlormethan odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (60 ml). Ethyl-acetát jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 20 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Poté jsme ethyl-acetátovou fázi vysušili pomocí bezvodého síranu sodného a zahustili na vakuové odparce. Produkt **18a** jsme se snažili izolovat sloupcovou chromatografií, ale kvůli špatné rozpustnosti v běžných rozpouštědlech a kvůli vzniku těžko dělitelné směsi látek se nám nepodařilo produkt **18a** izolovat.

2) Produkty **18b-d** jsme připravovali stejným postupem jako produkt **18a** - *viz výše postup 1)*. Cílové produkty **18b-d** se nám rovněž nepodařilo izolovat.

*b) Obecný postup přípravy cílových produktů **18a-d** za použití triethylaminu jako báze:*

Připravený hydrazid **17a-d** jsme rozpustili ve 25 ml dichlormethanu a přidali jsme triethylamin a 3,5-dinitrobenzoylchlorid. Reakce probíhala za laboratorní teploty a stálého míchání. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 50:1 + 1 % Et_3N). Reakci jsme ukončili a vzniklé krystaly jsme odfiltrovali a opatrně promyli diethyletherem (2 × 4 ml) a vodou (2 × 4 ml). Poté jsme provedli kontrolní TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 50:1 + 1 % Et_3N) a produkt jsme ihned podrobili další reakci.

1) *Látku **18a** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Použili jsme 0,110 g připraveného hydrazidu **17a** (0,57 mmol) a po rozpuštění ve 25 ml dichlormethanu jsme přidali 86 µl

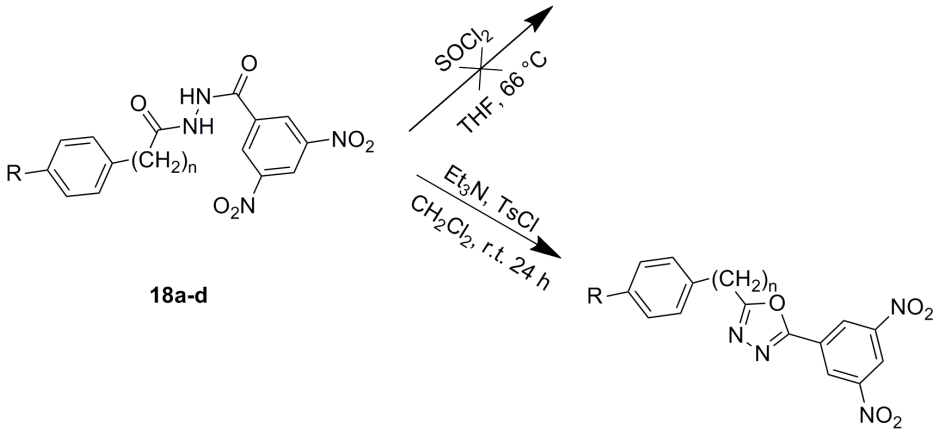
triethylaminu (0,62 mmol) a 0,131 g 3,5-dinitrobenzoylchloridu (0,57 mmol).

- Reakční čas: 24 hodin.

2) *Látku **18b** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Do reakce jsme vložili 0,4 g připraveného hydrazidu **17b** (2,01 mmol), který reagoval s 0,464 g 3,5-dinitrobenzoylchloridu (2,01 mmol) za použití triethylaminu (0,31 ml; 2,21 mmol) jako báze.
   - Reakční čas: 19 hodin.
3) *Látku **18c** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Při reakci jsme nechali reagovat připravený hydrazid **17c** (0,3 g; 2,00 mmol) s 3,5-dinitrobenzoylchloridem (0,461 g; 2,00 mmol) za použití triethylaminu (0,31 ml; 2,20 mmol) jako báze.
   - Reakční čas: 18 hodin.
4) *Látku **18d** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Do reakce jsme vložili 0,5 g připraveného hydrazidu **17d** (2,81 mmol), který jsme nechali reagovat s 3,5-dinitrobenzoylchloridem (0,647 g; 2,81 mmol) za použití 0,43 ml triethylaminu (3,09 mmol) jako báze.
   - Reakční čas: 25 hodin.

7.5.4 Příprava substituovaných oxadiazolů 15a-15d

Obecné schéma:



R = OCH_3	n = 2	**15a**
R = Cl	n = 2	**15b**
R = H	n = 1	**15c**
R = CH_3	n = 2	**15d**

*a) Obecný postup přípravy cílových produktů **15a-d** v prostředí chloridu thionylu:*

Produkt předchozí reakce, bishydrazid **18a-d** (0,150 g), jsme rozpustili v 5 ml tetrahydrofuranu a přidali jsme 1 ml chloridu thionylu. Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 19 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 50:1). Po ukončení reakce jsme rozpouštědlo odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (40 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 20 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 20 ml). Ethyl-acetátovou fázi jsme vysušili bezvodým síranem sodným a zahustili na vakuové odparce. Dle TLC (mob. fáze: chloroform : methanol, 50:1) vznikala těžko dělitelná směs látek. Cílové produkty **15a-d** se nám nepodařilo tímto postupem izolovat.

*b) Obecný postup přípravy cílových produktů **15a-d** v prostředí p-toluensulfonylchloridu a triethylaminu:*

Reakci jsme prováděli v bezvodých podmínkách pod atmosférou argonu. Z tohoto důvodu jsme museli použít chemikálie bezvodé (triethylamin a dichlormethan). K produktu předchozí reakce, bishydrazidu **18a-d**, jsme přidali *p*-toluensulfonylchlorid (TsCl) a po vytvoření argonové atmosféry jsme přidali bezvodý dichlormethan

a bezvodý triethylamin. Reakce probíhala za laboratorní teploty a stálého míchání po dobu 24 hodin. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1). Reakci jsme ukončili a rozpouštědlo jsme odpařili na vakuové odparce. Odparek jsme rozpustili v chloroformu (40-90 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem Na_2CO_3 (2 × 25 ml) a s 20% roztokem NaCl (1 × 25 ml). Chloroformovou fázi jsme vysušili bezvodým síranem sodným a zahustili na vakuové odparce. Cílové produkty **15a-d** jsme izolovali pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze: dichlormethan).

1) *Látku **15a** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Při reakci jsme použili: bishydrazid **18a** (0,100 g; 0,26 mmol), *p*-toluensulfonylchlorid (0,049 g; 0,26 mmol), 10 ml dichlormethanu a 89 µl triethylaminu (0,64 mmol).
2) *Látku **15b** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Do reakce jsme vložili: bishydrazid **18b** (0,300 g; 0,76 mmol), *p*-toluensulfonylchlorid (0,146 g; 0,76 mmol), 15 ml dichlormethanu a 0,26 ml triethylaminu (1,91 mmol).
3) *Látku **15c** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Do reakce jsme vložili: bishydrazid **18c** (0,250 g; 0,73 mmol), *p*-toluensulfonylchlorid (0,138 g; 0,73 mmol), 15 ml dichlormethanu a 0,25 ml triethylaminu (1,82 mmol).
4) *Látku **15d** jsme připravili dle obecného postupu b):*
   - Při reakci jsme použili: : bishydrazid **18d** (0,455 g; 1,22 mmol), *p*-toluensulfonylchlorid (0,233 g; 1,22 mmol), 20 ml dichlormethanu a 0,42 ml triethylaminu (3,06 mmol).

*2-(3,5-dinitrofenyl)-5-(2-(4-methoxyfenyl)ethyl)-1,3,4-oxadiazol (**15a**)*

Vzhled: žlutá krystalická látka

Molární hmotnost: 370,32 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,095 g

Praktický výtěžek: 0,085 g (**89 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,98 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,95 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,21 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,28 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,08 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167,83, 161,47, 158,01, 148,92, 131,74, 129,59, 126,36, 126,28, 121,05, 113,96, 55,13, 30,87, 26,99

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 55,14; H, 3,81; N, 15,13
- nalezeno: C, 55,46; H, 3,96; N, 14,30

Teplota tání: 130-133 °C

*2-(2-(4-chlorfenyl)ethyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**15b**)*

Vzhled: narůžovělá krystalická látka

Molární hmotnost: 374,74 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,286 g

Praktický výtěžek: 0,203 g (**71 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,99 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,95 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,35 (s, 4H), 3,33 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,15 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167,59, 161,52, 148,91, 138,94, 131,22, 130,54, 128,47, 126,37, 126,26, 121,07, 30,87, 26,44

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 51,28; H, 2,96; N, 14,95
- nalezeno: C, 51,62; H, 2,91; N, 14,76

Teplota tání: 154-157 °C

*2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**15c**)*

Vzhled: béžová krystalická látka

Molární hmotnost: 326,27 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,237 g

Praktický výtěžek: 0,166 g (**70 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,98 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,94 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,44 – 7,28 (m, 5H), 4,44 (s, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167,12, 161,82, 148,88, 134,27, 129,17, 128,96, 127,52, 126,47, 126,25, 121,10, 30,94

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 55,22; H, 3,09; N, 17,17
- nalezeno: C, 54,20; H, 2,84; N, 16,92

Teplota tání: 149-151 °C

*2-(3,5-dinitrofenyl)-5-(2-(4-methylfenyl)ethyl)-1,3,4-oxadiazol (**15d**)*

Vzhled: nažloutlá krystalická látka

Molární hmotnost: 354,32 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,433 g

Praktický výtěžek: 0,275 g (**64 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8,98 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 8,94 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,10 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H), 3,30 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,10 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 2,26 (s, 3H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 167,80, 161,46, 148,92, 136,78, 135,54, 129,12, 128,44, 126,35, 126,26, 121,05, 31,30, 26,78, 20,77

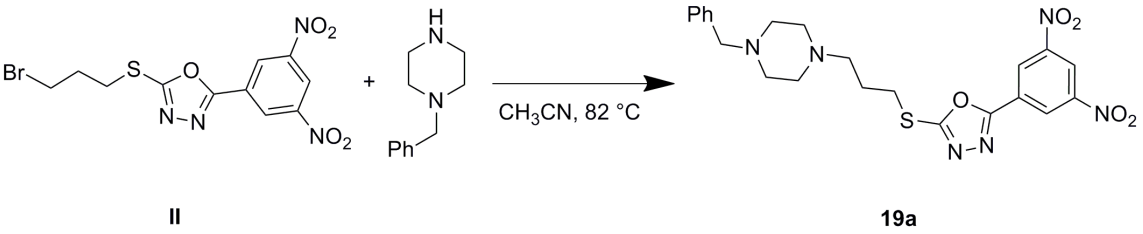
Elementární analýza:

- vypočteno: C, 57,63; H, 3,98; N, 15,81
- nalezeno: C, 57,94; H, 4,05; N, 15,57

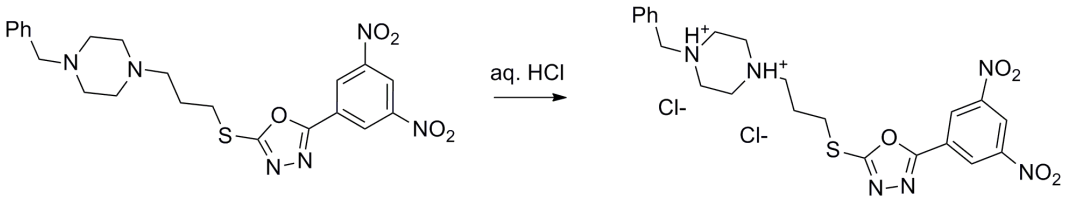
Teplota tání: 146-148 °C

7.6 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b

Obecné schéma:



II **19a**



19a **19b**

*a) Postup přípravy oxadiazolu **19a***

Výchozí látku **II** (0,277 g; 0,71 mmol), která byla připravena na katedře anorganické a organické chemie Janem Němečkem, jsme rozpustili ve 20 ml acetonitrilu a přidali jsme 2 molární ekvivalenty *N*-benzylpiperazinu (0,251 g; 1,42 mmol). Tuto reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 13 hodin a monitorovali jsme ji pomocí TLC (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1 + 1 % Et_3N). Po ukončení reakce jsme odpařili acetonitril na vakuové odparce a odparek jsme rozpustili v ethyl-acetátu (40 ml), který jsme vytřepali s 10% roztokem $KHCO_3$ (3 × 30 ml). Ethyl-acetátovou fázi jsme vysušili bezvodým síranem sodným a zahustili na vakuové odparce. Cílový produkt **19a** jsme izolovali pomocí sloupcové chromatografie (mob. fáze: hexan : ethyl-acetát, 2:1 + 1 % Et_3N).

*b) Postup přípravy dihydrochloridu **19b***

K připravené látce **19a** (0,198 g) jsme přidali 20 ml 1M kyseliny chlorovodíkové a směs jsme za stálého míchání zahřívali do úplného rozpuštění látky. Dle potřeby jsme

přidávali vodu. Po ukončení reakce jsme roztok odpařili na vakuové odparce a krystaly jsme vysušili ve vakuu.

*2-((3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)sulfanyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**19a**)*

Vzhled: nahnědlá olejovitá látka

Molární hmotnost: 484,53 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,345 g

Praktický výtěžek: 0,207 g (**60 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3COCD_3): δ 9,13 – 9,09 (m, 3H), 7,35 – 7,20 (m, 5H), 3,52 – 3,44 (m, 4H), 2,60 – 2,29 (m, 10H), 2,08 – 2,03 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3COCD_3): δ 167,49, 163,40, 150,08, 139,61, 129,62, 128,88, 127,74, 127,62, 126,86, 121,48, 63,42, 57,03, 53,93, 53,89, 31,35, 27,23

*1-benzyl-4-(3-((5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)sulfanyl)propyl)piperazin dihydrochlorid (**19b**)*

Vzhled: béžová krystalická látka

Molární hmotnost: 557,48 g/mol

Teoretický výtěžek: 0,228

Praktický výtěžek: 0,221 g (**97 %**)

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ 9,16 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H), 9,05 (t, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,46 – 7,37 (m, 5H), 4,62 (m, 2H), 4,31 (s, 2H), 3,50 (s, 8H), 3,33 (m, 2H), 2,28 – 2,20 (m, 2H)

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ 166,83, 163,33, 148,86, 131,08, 130,46, 130,41, 129,35, 126,85, 125,67, 121,71, 60,50, 55,08, 48,92, 48,34, 28,64, 23,70

Elementární analýza:

- vypočteno: C, 47,40; H, 4,70; N, 15,08; S, 5,75
- nalezeno: C, 44,62; H, 5,13; N, 13,96; S, 4,87

Teplota tání: 220 °C (rozklad)

8. VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Příprava substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazolů

V této diplomové práci jsme se nejprve zabývali přípravou derivátů tetrazolu nesoucích v poloze 1 či 2 substituovaný benzyl. Při těchto reakcích vznikaly především 2-regioizomery (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**), které se nám podařilo izolovat ve výtěžku 26-87 %. Důvodem byla 3,5-dinitrofenylová skupina, která svými elektronakceptorovými vlastnostmi a sterickým bráněním orientuje substituci do polohy 2 tetrazolu. Za povšimnutí stojí nízký výtěžek (26 %) látky **1a**. Důvodem může být krátká reakční doba (1,5 hodiny). V malém výtěžku (4-20 %) se nám podařilo izolovat také 1-regioizomery (**1b**, **2b**, **3b**, **4b**). Dle NMR spektroskopie jsme derivát **4b** nezískali v dostatečné čistotě a jeho opětovnou izolaci sloupcovou chromatografií pomocí jiné mobilní fáze jsme již neprováděli.

Reakční čas se pohyboval od 1,5-9 hodin. Látky jsme izolovali sloupcovou chromatografií, přičemž u látek **2a**, **3a**, **4a** a **2b**, **3b**, **4b** jsme nejdříve použili méně polární mob. fázi pro získání 2-regioizomeru a poté polárnější mob. fázi pro izolaci 1-regioizomeru. 2-regioizomery měly vždy vyšší hodnotu R_f ve srovnání s odpovídajícím 1-regioizomerem, což je v souladu s dříve publikovanými daty.[31] Dělené látky jsme naadsorbovali na silikagel, který jsme opatrně nanesli na sloupec. Zpočátku jsme použili mobilní fázi s malým přídavkem chloroformu, abychom tak podpořili rozpustnost produktů v mobilní fázi.

- Připravené 2-regioizomery:
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(3-fluorbenzyl)-2*H*-tetrazol (**1a**)
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(4-methylbenzyl)-2*H*-tetrazol (**2a**)
    - 2-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol (**3a**)
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-2-(3-methoxybenzyl)-2*H*-tetrazol (**4a**)

- Připravené 1-regioizomery:
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(3-fluorbenzyl)-1*H*-tetrazol (**1b**)
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(4-methylbenzyl)-1*H*-tetrazol (**2b**)
    - 1-(3-chlorbenzyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazol (**3b**)
    - 5-(3,5-dinitrofenyl)-1-(3-methoxybenzyl)-1*H*-tetrazol (**4b**)

8.2 Příprava derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus

a) Příprava alkylačního činidla:

Nejdříve jsme museli připravit alkylační činidla (**5a**, **7**, **11**), která jsme v další reakci použili k alkylaci nasycených dusíkatých heterocyklů. Při přípravě chlorethyltetrazolu **5a** nedocházelo pouze k alkylaci výchozího tetrazolu **I**, ale také ke spontánní eliminaci na vinyl derivát **5b**. Výtěžek látky **5a** byl 38 % a výtěžek vinyl derivátu **5b** byl 6 %. Z důvodu vzniku vinyl derivátu jsme se rozhodli připravit deriváty s delším postranním uhlíkovým řetězcem (**7**, **11**), u kterých vznik vinyl derivátu nehrozil. Výtěžek připravených látek **7** a **11** byl 60-63 %.

Při přípravě chlorethyltetrazolu **5a** jsme výchozí tetrazol **I** rozpustili v 1,2-dichlorethanu, který v této reakci plnil funkci rozpouštědla a alkylačního činidla. Reakční směs jsme zahřívali na 62 °C po dobu 9,5 hodin. V dalších reakcích, které vedly k přípravě brompropyltetrazolu **7** a brombutyltetrazolu **11**, jsme jako rozpouštědlo použili acetonitril a reakční směs jsme zahřívali k varu. Tento postup se ukázal jako výhodný, protože se nám podařilo zkrátit reakční dobu z 9,5 hodin na 5 hodin a také se zvýšila výtěžnost reakce.

Látky **5a** a **7** jsme čistili sloupcovou chromatografií. Produkt **5a** byl adsorbován na silikagel. Na začátku sloupcové chromatografie jsme použili mobilní fázi s přídavkem chloroformu, abychom tak podpořili rozpustnost produktu v mobilní fázi. Látka **11** byla velice špatně rozpustná v běžných rozpouštědlech (toluen, chloroform, aceton, hexan). Této nerozpustnosti jsme využili k čištění produktu - po vytřepávání a odpaření ethyl-acetátu jsme odparek rozmíchali v hexanu, ve kterém je náš produkt **11** nerozpustný, avšak alkylační činidlo 1,4-dibrombutan se v hexanu rozpouští. Tímto způsobem jsme

tedy dokázali izolovat čistý produkt **11** a to bez použití sloupcové chromatografie, což vedlo k urychlení procesu čištění.

- Připravená alkylační činidla:
    - 2-(2-chlorethyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol (**5a**)
    - 2-(3-brompropyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol (**7**)
    - 2-(4-brombutyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol (**11**)

b) Alkylace nasycených dusíkatých heterocyklů připravenými alkylačními činidly:

V dalším kroku jsme připravená alkylační činidla (**5a**, **7**, **11**) použili k alkylaci nasycených dusíkatých heterocyklů. Ve výtěžku 76-93 % se nám podařilo izolovat cílové produkty **8**, **9**, **10a** a **12a**. Kvůli očekávané spontánní eliminaci se nám ale nepodařilo izolovat produkty **6a** a **6b** - při této reakci vznikal kvantitativně vinyl derivát **5b**.

Při přípravě látek **8**, **9**, **6a** a **6b** jsme jako bázi použili uhličitan draselný. Látky **8** a **9** jsou rozpustné ve vodě, a proto jsme po ukončení reakce reakční směs přefiltrovali, vytřepávání jsme neprováděli a ihned jsme produkt čistili sloupcovou chromatografií. Při přípravě látky **10a** jsme použili 2 molární ekvivalenty *N*-benzylpiperazinu, přičemž druhý molární ekvivalent plnil funkci báze. Při přípravě látky **12a** jsme jako bázi použili triethylamin. Látky **10a** a **12a** jsme vzhledem k jejich nerozpustnosti ve vodě mohli čistit vytřepáváním. Dále jsme tyto produkty čistili sloupcovou chromatografií. Typ použité báze neměl zásadní vliv na výtěžnost reakcí.

U čištění látky **10a** sloupcovou chromatografií bylo poněkud problematické zvolit optimální mobilní fázi. Nejprve jsme použili mob. fázi: chloroform : methanol, 19:1. Při tomto čištění jsme ale získávali produkt znečištěný výchozí látkou **7**. Proto jsme zvolili mob. fázi: hexan : ethyl-acetát, 2:1 + 1 % Et_3N, kdy ale došlo k vykrystalizování produktu na sloupci. Nakonec jsme tedy použili mob. fázi: chloroform, kterou jsme následně zrychlili na mob. fázi: chloroform : methanol, 19:1. Tímto postupem se nám podařilo izolovat čistý produkt **10a**. Domníváme se, že hlavním problémem bylo velké množství produktu, které se ze začátku nestačilo zachytit na stacionární fázi a tak u prvního čištění (mob. fáze: chloroform : methanol, 19:1) docházelo k získání produktu znečištěného výchozí látkou **7**. Tento názor opíráme

také o fakt, že látku **10a** připravil již dříve stejným postupem (mob. fáze: chloroform : methanol, 19:1) Jan Němeček, který použil pouze 0,5 g výchozí látky.

- Připravené deriváty tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem:
    - 1-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)propyl)-4-methylpiperazin (**8**)
    - 4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)propyl)morfolin (**9**)
    - 1-benzyl-4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)propyl)piperazin (**10a**)
    - 1-benzyl-4-(4-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)butyl)piperazin (**12a**)

8.3 Příprava dihydrochloridů látek 10a a 12a

Dalším úkolem bylo připravit ve vodě rozpustné soli připravených derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus a vykazujících vysokou antimykobakteriální aktivitu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit dihydrochloridy látek **10a** a **12a**, jelikož tyto látky vykazovaly velice dobrou antimykobakteriální aktivitu (viz kapitola 8.7 Tabulka 4). Reakce, vedoucí k přípravě dihydrochloridů **10b** a **12b**, probíhaly kvantitativně.

- Připravené dihydrochloridy látek **10a** a **12a**:
    - 1-benzyl-4-(3-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)propyl)piperazin dihydrochlorid (**10b**)
    - 1-benzyl-4-(4-(5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazol-2-yl)butyl)piperazin dihydrochlorid (**12b**)

8.4 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem I

Nejdříve bylo třeba připravit chloridy výchozích kyselin (**14a-c**, **14e**), které jsme nechali reagovat s výchozím tetrazolem **I**, přičemž mělo dojít k eliminaci dusíku a uzavření oxadiazolového kruhu. Přestože je tato reakce v literatuře popsána, v našem případě vznikala těžko dělitelná směs látek, a proto se nám produkt nepodařilo izolovat (látky **15b** a **15e**), anebo jsme v případě látek **15a** a **15c** produkt izolovali pouze v malém

výtěžku (5-15 %). Domníváme se, že zásadní problém je v přípravě chloridu kyseliny, který nemůžeme monitorovat, a který je náchylný k hydrolýze zpět na výchozí kyselinu. Problém mohla způsobit také nedostatečná čistota halogenidu kyseliny, tedy přítomnost zbytků HCl či SO_2. Proto jsme se rozhodli připravit deriváty oxadiazolu jiným způsobem - reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu.

- Deriváty oxadiazolu připravené reakcí chloridu kyseliny s tetrazolem **I**:
    - 2-(3,5-dinitrofenyl)-5-(2-(4-methoxyfenyl)ethyl)-1,3,4-oxadiazol (**15a**)
    - 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**15c**)

8.5 Příprava derivátů oxadiazolu reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu

*a) Příprava esterů **16a**-**16d**:*

V prvním kroku jsme provedli esterifikaci výchozích kyselin **13a-d**. Tato reakce probíhala dle očekávání ochotně ve výtěžku 81-95 %. Výhodou bylo také jednoduché čištění, kdy jsme po vytřepávání nemuseli provádět sloupcovou chromatografii, což vedlo k urychlení izolace čistých esterů **16a-d**. Identitu a čistotu produktů jsme ověřili pomocí TLC a NMR spektroskopie.

- Připravené estery výchozích kyselin:
    - ethylester 3-(4-methoxyfenyl)propanové kyseliny (**16a**)
    - ethylester 3-(4-chlorfenyl)propanové kyseliny (**16b**)
    - ethylester 2-fenyloctové kyseliny (**16c**)
    - ethylester 3-(4-methylfenyl)propanové kyseliny (**16d**)

*b) Příprava hydrazidů **17a-17d**:*

Přípravu hydrazidů **17a-d** jsme museli optimalizovat.

U látek **17a** a **17b** byl reakční čas 19 hodin a použili jsme 2 molární ekvivalenty 80% monohydrátu hydrazinu. Produkty jsme čistili rekrystalizací ze směsi ethanol/voda, kdy jsme ale získávali produkty znečištěné výchozími estery **16a** a **16b**, a proto jsme museli produkty **17a** a **17b** od výchozích esterů vyčistit. Navíc jsme zjistili, že produkty **17a** a **17b** jsou částečně rozpustné v ethanolu a ve vodě, což vedlo ke ztrátám produktu a malému výtěžku (32-46 %).

Při přípravě hydrazidu **17c** jsme prodloužili reakční dobu na 24 hodin a použili jsme 5 molárních ekvivalentů 80% monohydrátu hydrazinu. Čištění rekrystalizací ze směsi ethanol/voda vedlo v tomto případě k izolaci čistého produktu **17c**, a tak jsme tento produkt nemuseli dále čistit. Nicméně kvůli částečné rozpustnosti hydrazidu **17c** v ethanolu a ve vodě docházelo při čištění opět ke ztrátám produktu, proto jsme dokázali izolovat pouze 50 % teoretického výtěžku.

Při přípravě hydrazidu **17d** jsme taktéž prodloužili reakční dobu na 24 hodin a použili jsme 5 molárních ekvivalentů 80% monohydrátu hydrazinu. Tímto postupem jsme s největší pravděpodobností dosáhli spotřebování výchozího esteru **16d**. Z důvodu ztrát produktů při rekrystalizaci ze směsi ethanol/voda jsme zvolili jiný způsob čištění. Po ukončení reakce jsme ethanol odpařili na vakuové odparce a odparek jsme rozsuspendovali v diethyletheru. Zatímco cílový produkt **17d** není v diethyletheru rozpustný, 80% monohydrát hydrazinu rozpustný v diethyletheru je. Krystaly jsme odfiltrovali a vysušili ve vakuu. Tímto způsobem se nám podařilo získat 77 % teoretického výtěžku hydrazidu **17d**.

- Připravené hydrazidy **17a**-**17d**:
    - hydrazid 3-(4-methoxyfenyl)propanové kyseliny (**17a**)
    - hydrazid 3-(4-chlorfenyl)propanové kyseliny (**17b**)
    - hydrazid 2-fenyloctové kyseliny (**17c**)
    - hydrazid 3-(4-methylfenyl)propanové kyseliny (**17d**)

c) Acylace připravených hydrazidů 3,5-dinitrobenzoylchloridem:

Acylaci připravených hydrazidů 3,5-dinitrobenzoylchloridem jsme prováděli dvěma postupy - nejprve za přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu jako báze a poté jsme jako bázi použili triethylamin. Obě reakce probíhaly za laboratorní teploty. Použitá báze ale neměla zásadní vliv na průběh reakce. Významnější byl postup izolace cílových produktů **18a-d**.

Při použití *N,N*-diisopropylethylaminu jako báze byl reakční čas 21 hodin. Produkty **18a-d** jsme čistili vytřepáváním a následně sloupcovou chromatografií. Vzhledem k špatné rozpustnosti v běžných rozpouštědlech a kvůli vzniku těžko dělitelné směsi látek se nám ale nepodařilo cílové produkty **18a-d** izolovat.

Proto jsme reakci zopakovali. Tentokrát v přítomnosti triethylaminu jako báze, kdy reakční doba byla 18-25 hodin. Po ukončení reakce jsme vzniklé krystaly odfiltrovali a opatrně promyli diethyletherem (vyčištění od organických nečistot a odstranění zabarvení krystalů) a vodou (zbavení se solí). Produkty **18a-d** jsme poté ihned podrobili další reakci.

*d) Příprava substituovaných oxadiazolů **15a**-**15d**:*

Také postup uzavření oxadiazolového kruhu jsme museli optimalizovat.

Při prvním postupu jsme bishydrazid **18a-d** rozpustili v tetrahydrofuranu a přidali jsme 1 ml chloridu thionylu. Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 19 hodin. Po vytřepávání jsme pomocí TLC zjistili, že i když je tato reakce v literatuře popsána, v našem případě vznikala těžko dělitelná směs látek a tak se nám cílové produkty **15a-d** nepodařilo tímto způsobem izolovat.

Proto jsme zvolili mírnější podmínky, které vedly k získání produktů **15a-d**. Tyto reakce jsme prováděli v bezvodých podmínkách pod atmosférou argonu. K bishydrazidu **18a-d** jsme přidali *p*-toluensulfonylchlorid a po vytvoření ochranné atmosféry jsme přidali bezvodý dichlormethan a bezvodý triethylamin. Reakci jsme prováděli za laboratorní teploty a stálého míchání po dobu 24 hodin. Po vytřepávání jsme cílové produkty **15a-d** izolovali pomocí sloupcové chromatografie ve výtěžku 64-89 %. Identitu a čistotu produktů jsme ověřili pomocí NMR spektroskopie.

- Deriváty oxadiazolu připravené reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu:
    - 2-(3,5-dinitrofenyl)-5-(2-(4-methoxyfenyl)ethyl)-1,3,4-oxadiazol (**15a**)
    - 2-(2-(4-chlorfenyl)ethyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**15b**)
    - 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**15c**)
    - 2-(3,5-dinitrofenyl)-5-(2-(4-methylfenyl)ethyl)-1,3,4-oxadiazol (**15d**)

8.6 Příprava oxadiazolu 19a a jeho dihydrochloridu 19b

Nakonec jsme připravili oxadiazolový derivát **19a** obsahující síru ve spojovacím řetězci mezi oxadiazolovým kruhem a nasyceným dusíkatým heterocyklem. Výchozí látka **II** byla již dříve připravena na katedře anorganické a organické chemie Janem Němečkem. Podobně jako u látky **10a** jsme při přípravě látky **19a** použili 2 molární ekvivalenty *N*-benzylpiperazinu, přičemž 1 molární ekvivalent vystupoval jako báze. Reakční směs jsme zahřívali k varu po dobu 13 hodin. Po vytřepávání jsme produkt **19a** izolovali pomocí sloupcové chromatografie ve výtěžku 60 %.

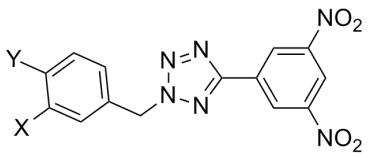
Jelikož derivát **19a** vykazoval velice dobrou antimykobakteriální aktivitu (viz kapitola 8.7 Tabulka 7), rozhodli jsme se připravit jeho ve vodě rozpustný dihydrochlorid **19b**. Tato reakce probíhala kvantitativně.

- Připravený oxadiazol **19a** a jeho dihydrochlorid **19b**:
    - 2-((3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)sulfanyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol (**19a**)
    - 1-benzyl-4-(3-((5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)sulfanyl)propyl)piperazin dihydrochlorid (**19b**)

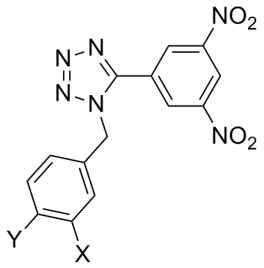
8.7 Testování antimykobakteriální aktivity in vitro

U sedmnácti připravených sloučenin jsme hodnotili *in vitro* antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a *M. avium* CNCTC My 330/88. Tyto kmeny byly poskytnuty Českou národní sbírkou typových kultur (ČNSTK). Čtvrtým testovaným kmenem byl klinický izolát *M. kansasii* 6509/96. Dvě připravené látky jsme otestovali na jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivitu proti klinicky izolovaným MDR/XDR kmenům *M. tuberculosis* Praha 1, *M. tuberculosis* Praha 4, *M. tuberculosis* Praha 131, *M. tuberculosis* 9449/2007, *M. tuberculosis* 234/2005, *M. tuberculosis* 7357/1998 a *M. tuberculosis* 8666/2010. Testování provedlo Oddělení bakteriologie a mykologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Pro hodnocení *in vitro* antimykobakteriální aktivity byla zvolena mikrometoda pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací léků v Šulově půdě (SEVAC, Praha). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) a následně naneseny na Šulovu půdu v koncentracích 500, 250, 125, 62, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 a 0.03 µmol/l. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 37 °C. *In vitro* antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace v µmol/l (MIC). Jedná se o hodnotu, která udává nejnižší koncentraci látky v µmol/l, která viditelně inhibuje růst mykobakterií. Hodnota MIC byla zjišťována po 14 a 21 dnech inkubace u *M. tuberculosis a M. avium* a po 7, 14 a 21 dnech inkubace u obou kmenů *M. kansasii*. Jako standard byl pro hodnocení *in vitro* antimykobakteriální aktivity zvolen isoniazid (INH).

Tabulka 2: In vitro antimykobakteriální aktivita substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazolů vyjádřená jako MIC [µmol/l]



X = F, Y = H **1a**
X = H, Y = CH_3 **2a**
X = Cl, Y = H **3a**
X = OCH_3, Y = H **4a**

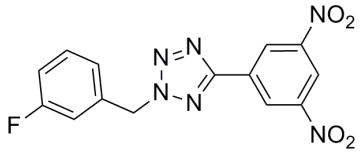


X = H, Y = CH_3 **2b**
X = OCH_3, Y = H **4b**

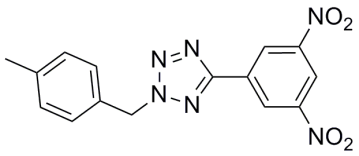
	M. tuberculosis My 331/88	*M. avium* My 330/88	*M. kansasii* My 235/80	*M. kansasii* My 6509/96
	14 / 21 dní		**7 / 14 / 21 dní**	
1a	1 / 1	8 / 16	1 / 2 / 2	0,5 / 1 / 2
2a	0,125 / 0,125	8 / 16	0,5 / 1 / 1	0,25 / 0,5 / 0,5
3a	0,5 / 0,5	4 / 8	1 / 2 / 2	0,5 / 1 / 2
4a	1 / 1	4 / 8	1 / 2 / 4	1 / 2 / 2
2b	1 / 2	8 / 16	1 / 2 / 4	2 / 4 / 4
INH	**0,5 / 1**	**>250**	**>250**	**4 / 4 / 4**

Z tabulky (Tabulka 2) je patrné, že 2-regioizomery vykazovaly v porovnání s isoniazidem velice dobrou antimykobakteriální aktivitu. Především pak látka **2a** se substitucí benzylu methylovou skupinou v poloze 4 vykazovala několikanásobně lepší aktivitu než zvolený standard. Naopak u 1-regioizomeru **2b** jsme zjistili, že v porovnání s isoniazidem je jeho antimykobakteriální účinnost horší. Pokud tedy porovnáme antimykobakteriální aktivitu obou regioizomerů, zjistíme, že na poloze substituce záleží: 2-regioizomery vykazují lepší aktivitu než 1-regioizomery. Toto tvrzení se shoduje s dříve publikovanými daty.[31]

Tabulka 3: In vitro antimykobakteriální aktivita vybraných substituovaných 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazolů proti klinicky izolovaným MDR/XDR kmenům M. tuberculosis vyjádřená jako MIC [µmol/l]



1a



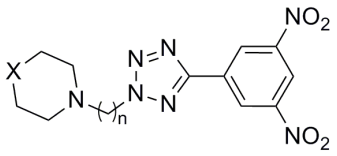
2a

	MDR/XDR kmeny *M. tuberculosis* MIC po 14 a 21 dnech inkubace						
	Praha 1	**Praha 4**	**Praha 131**	**9449/2007**	**234/2005**	**7357/1998**	**8666/2010**
1a	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
2a	0,125 0,25	0,125 0,125	0,125 0,125	0,125 0,125	0,125 0,125	0,125 0,125	0,125 0,125
streptomycin	R	R	R	R	R	R	R
isoniazid	R	R	R	R	R	R	R
ethambutol	R	R	R	S	R	R	R
rifampicin	R	R	R	R	R	R	R
ofloxacin	S	R	R	S	S	R	R
gentamicin	S	S	R	S	S	S	S
klofazimin	R	R	S	S	S	S	R
amikacin	S	S	R	S	S	S	S

R - kmen rezistentní k podanému antituberkulotiku; S - kmen citlivý k podanému antituberkulotiku

Látky **1a** a **2a** byly testovány na antimykobakteriální aktivitu vůči lékově rezistentním formám TB. Jak vyplývá z tabulky (Tabulka 3), tyto látky vykazují vysokou antimykobakteriální aktivitu proti MDR/XDR kmenům *M. tuberculosis*.

Tabulka 4: In vitro antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus vyjádřená jako MIC [µmol/l]



X = NCH_3	n = 3	**8**
X = O	n = 3	**9**
X = NBn	n = 3	**10a**
X = NBn	n = 4	**12a**

	M. tuberculosis My 331/88	*M. avium* My 330/88	*M. kansasii* My 235/80	*M. kansasii* My 6509/96
	14 / 21 dní		**7 / 14 / 21 dní**	
8	16 / 16	250 / 250	16 / 32 / >32	>32 / >32 / >32
9	16 / 16	500 / >500	16 / 32 / 32	16 / 32 / 32
10a	1 / 1	8 / 8	2 / 2 / 2	1 / 1 / 2
12a	0,5 / 0,5	2 / 4	0,5 / 1 / 1	2 / 2 / 2
INH	**0,5 / 1**	**>250**	**>250**	**4 / 4 / 4**

Z tabulky (Tabulka 4) je zřejmé, že antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem závisí na jejich lipofilitě. Lipofilnější deriváty s *N*-benzylpiperazinem vykazují lepší aktivitu (srovnatelnou či lepší než použitý standard) než méně lipofilní deriváty s morfolinem či *N*-methylpiperazinem.

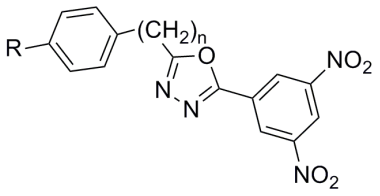
Tabulka 5: Porovnání in vitro antimykobakteriální aktivity (vyjádřena jako MIC v µmol/l) dihydrochloridů 10b a 12b a jejich neprotonizované formy 10a a 12a

10a	n = 1	**10b**
12a	n = 2	**12b**

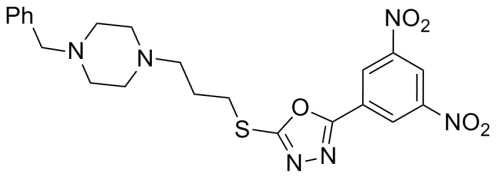
	M. tuberculosis My 331/88	*M. avium* My 330/88	*M. kansasii* My 235/80	*M. kansasii* My 6509/96
	14 / 21 dní		**7 / 14 / 21 dní**	
10a	1 / 1	8 / 8	2 / 2 / 2	1 / 1 / 2
10b	1 / 2	32 / 62	1 / 2 / 4	1 / 2 / 4
12a	0,5 / 0,5	2 / 4	0,5 / 1 / 1	2 / 2 / 2
12b	0,5 / 0,5	4 / 4	0,5 / 1 / 1	1 / 2 / 2
INH	**0,5 / 1**	**>250**	**>250**	**4 / 4 / 4**

Z hodnot uvedených v tabulce (Tabulka 5) vyplývá, že připravené dihydrochloridy **10b** a **12b** si v porovnání s jejich neprotonizovanou formou **10a** a **12a** zachovávají velice dobrou antimykobakteriální aktivitu.

Tabulka 6: Vliv přítomnosti síry v molekule substituovaných oxadiazolů na jejich in vitro antimykobakteriální aktivitu vyjádřenou jako MIC [µmol/l]



R = OCH_3 n = 2 **15a**
R = Cl n = 2 **15b**
R = H n = 1 **15c**
R = CH_3 n = 2 **15d**

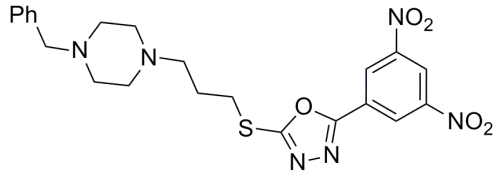


19a

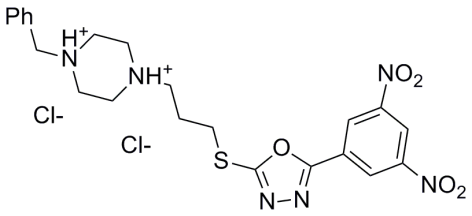
	M. tuberculosis My 331/88	*M. avium* My 330/88	*M. kansasii* My 235/80	*M. kansasii* My 6509/96
	14 / 21 dní		**7 / 14 / 21 dní**	
15a	0,125 / 0,125	8 / 16	0,125 / 0,25 / 0,5	0,125 / 0,25 / 0,5
15b	0,125 / 0,125	>250 / >250	0,125 / 0,25 / 0,5	0,06 / 0,125 / 0,25
15c	0,25 / 0,25	16 / 32	0,25 / 0,5 / 1	0,125 / 0,25 / 0,5
15d	0,03 / 0,06	2 / 4	0,125 / 0,25 / 0,25	0,06 / 0,125 / 0,125
19a	0,125 / 0,25	2 / 2	1 / 2 / 2	0,5 / 1 / 1
INH	**0,5 / 1**	**>250**	**>250**	**4 / 4 / 4**

Z tabulky (Tabulka 6) vyplývá, že pokud v molekule substituovaných oxadiazolů eliminujeme síru nebo ji nahradíme uhlíkem, získáme tak deriváty, které taktéž vykazují vysokou antimykobakteriální aktivitu. Především pak látka **15d** s methylovou skupinou vykazuje v porovnání s isoniazidem několikanásobně lepší aktivitu.

Tabulka 7: Porovnání in vitro antimykobakteriální aktivity (vyjádřena jako MIC v µmol/l) dihydrochloridu 19b a jeho neprotonizované formy 19a



19a



19b

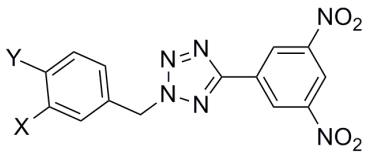
	M. tuberculosis My 331/88	*M. avium* My 330/88	*M. kansasii* My 235/80	*M. kansasii* My 6509/96
	14 / 21 dní		**7 / 14 / 21 dní**	
19a	0,125 / 0,25	2 / 2	1 / 2 / 2	0,5 / 1 / 1
19b	0,125 / 0,125	2 / 4	2 / 2 / 4	2 / 2 / 4
INH	**0,5 / 1**	**>250**	**>250**	**4 / 4 / 4**

Z tabulky (Tabulka 7) je patrné, že dihydrochlorid **19b** si v porovnání s jeho neprotonizovanou formou **19a** zachovává vysokou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*.

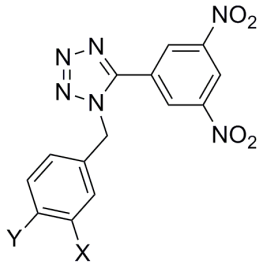
8.8 Testování cytotoxicity in vitro

Abychom získali představu o cytotoxicitě studovaných látek k liniím savčích buněk, hodnotili jsme vliv čtyř vybraných sloučenin na životaschopnost buněčné linie CHO-K1 (ovariální buňky čínského křečka) po 24 hodinách inkubace. U dvou sloučenin jsme dále hodnotili vliv na životaschopnost buněčné linie 3T3 (myší embryonální fibroblasty) po 72 hodinách inkubace. Postup hodnocení cytotoxicity *in vitro* je popsán v citované publikaci.[59] (viz příloha 14.1)

Tabulka 8: Vliv vybraných sloučenin na životaschopnost savčích buněk vyjádřený jako IC_{50} [µmol/l] po 24 hodinách inkubace pro CHO-K1 buňky nebo po 72 hodinách inkubace pro buňky 3T3



X = F, Y = H **1a**
X = H, Y = CH_3 **2a**
X = Cl, Y = H **3a**
X = OCH_3, Y = H **4a**



X = H, Y = CH_3 **2b**

	Buňky CHO-K1	**Buňky 3T3**	
	IC_{50} [µmol/l]	**IC_{50} [µmol/l]**	**Životaschopnost při 100 µmol/l**
1a	315 ± 58	>100[a]	95%
2a	200 ± 49	>100[a]	89%
2b	28 ± 4		
3a	27 ± 5		
4a	>100[a]		

[a] Hodnota představuje nejvyšší koncentraci testované látky, která nezpůsobila vysrážení během inkubace s buňkami.

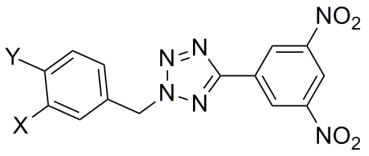
Výsledky v tabulce (Tabulka 8) ukazují, že vybrané sloučeniny mají poměrně malý vliv na životaschopnost savčích buněk. Při porovnání regioizomerů **2b** a **2a** zjistíme, že 1-regioizomer **2b** vykazuje nižší *in vitro* antimykobakteriální aktivitu a navíc je více cytotoxický než jeho protějšek 2-regioizomer **2a**.

8.9 Testování antimykotické a antibakteriální aktivity in vitro

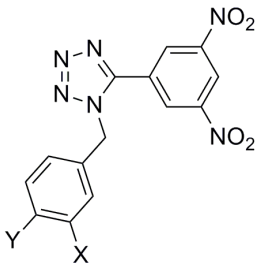
Pro získání představy o selektivitě antimykobakteriálního účinku jsme u čtyř vybraných látek hodnotili také jejich aktivitu vůči osmi kmenům vláknitých hub a osmi kmenům bakterií. Pro hodnocení těchto aktivit byla použita metoda mikroředění v bujónu. Tato metoda byla provedena podle pravidel CLSI/EUCAST (Institut pro klinické a laboratorní standardy/Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti)

s drobnými modifikacemi. Postup hodnocení antimykotické a antibakteriální aktivity *in vitro* je popsán v citované publikaci.[59] (viz příloha 14.1)

Tabulka 9: In vitro antimykotická aktivita vybraných látek vyjádřená jako MIC [µmol/l]



X = H, Y = CH_3 **2a**
X = Cl, Y = H **3a**
X = OCH_3, Y = H **4a**



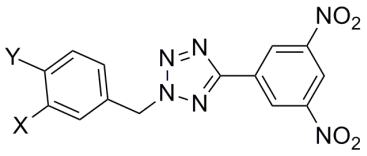
X = H, Y = CH_3 **2b**

	Kmeny kvasinek									
	CA		**CT**		**CK**		**CG**		**TA**	
	24 h	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**
2a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
2b	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FLU	0,82	-	1,6	-	105	-	26	-	210	-
AMB	0,54	-	0,54	-	1	-	0,54	-	0,27	-

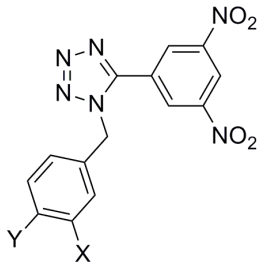
	Kmeny vláknitých hub					
	AF		**AC**		**TM**	
	24 h	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**120 h**
2a	>500	>500	>500	>500	>500	>500
2b	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3a	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4a	>500	>500	>500	>500	>500	>500
FLU	>500	-	>500	-	105	-
AMB	0,54	-	1	-	0,54	-

CA - *Candida albicans* ATCC 44859; **CT** - *Candida tropicalis* 156; **CK** - *Candida krusei* E28; **CG** - *Candida glabrata* 20/I; **TA** - *Trichosporon asahii* 1188; **AF** - *Aspergillus fumigatus* 231; **AC** - *Absidia corymbifera* 272; **TM** - *Trichophyton mentagrophytes* 445; **FLU** – flukonazol; **AMB** – amfotericin B

Tabulka 10: In vitro antibakteriální aktivita vybraných látek vyjádřená jako MIC [µmol/l]



X = H, Y = CH_3 **2a**
X = Cl, Y = H **3a**
X = OCH_3, Y = H **4a**



X = H, Y = CH_3 **2b**

	Kmeny grampozitivních koků							
	SA		**MRSA**		**SE**		**EF**	
	24 h	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**
2a	31,25	31,25	>500	>500	62,5	62,5	>500	>500
2b	125	125	125	125	250	250	250	250
3a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
VAN	0,35	-	0,35	-	0,35	-	0,7	-
GEN	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kmeny gramnegativních tyček							
	EC		**KP**		**KP-E**		**PA**	
	24 h	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**
2a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
2b	500	500	500	500	500	500	>500	>500
3a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
VAN	-	-	-	-	-	-	-	-
GEN	0,26	-	0,26	-	0,26	-	1	-

SA - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; **MRSA -** meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* HK5996/08; **SE -** *Staphylococcus epidermidis* HK6966/08; **EF -** *Enterococcus* sp. HK14365/08; **EC -** *Escherichia coli* ATCC 8739; **KP -** *Klebsiella pneumoniae* HK11750/08; **KP-E** - *Klebsiella pneumoniae* HK14368/08 produkující širokospektré beta-laktamázy; **PA -** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; **VAN** – vankomycin; **GEN** – gentamicin

Z tabulek (Tabulka 9 a Tabulka 10) je zřejmé, že vybrané látky nevykazují výraznou antimykotickou či antibakteriální aktivitu vůči testovaným kmenům, a tak hodnoty těchto tabulek potvrzují selektivitu antimykobakteriální aktivity testovaných látek. Látky **2a** a **2b** sice vykazují malou účinnost i proti některým grampozitivním kokům, ale ve srovnání s vankomycinem je jejich aktivita zanedbatelná.

9. ZÁVĚR

V této práci jsme se pokusili navázat na předchozí práci naší skupiny na Katedře anorganické a organické chemie FaF UK, při které bylo zjištěno, že 2,5- a 1,5-disubstituované tetrazoly a 2,5-disubstituované oxadiazoly, které nesou 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinu, vykazují vysokou antimykobakteriální aktivitu. Strukturu těchto látek jsme upravili odstraněním methylsulfanylového spojovacího řetězce a připravili jsme tak dvacet cílových derivátů tetrazolu a oxadiazolu obsahujících 3,5-dinitrofenylovou skupinu přímo navázanou na příslušné heterocykly.

Nejprve jsme připravili sérii 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů. U pěti látek z této série jsme hodnotili jejich antimykobakteriální aktivitu *in vitro* a cytotoxicitu *in vitro*. Zjistili jsme, že 2-regioizomery vykazovaly v porovnání s isoniazidem velice dobrou antimykobakteriální aktivitu. Všech pět látek mělo poměrně malý vliv na životaschopnost savčích buněk. Avšak při porovnání 1-regioizomeru (**2b**) a 2-regioizomeru (**2a**) můžeme vidět, že 1-regioizomer vykazuje nižší *in vitro* antimykobakteriální aktivitu a vyšší *in vitro* cytotoxicitu. U dvou látek této série jsme hodnotili jejich antimykobakteriální aktivitu vůči lékově rezistentním formám TB a zjistili jsme, že jejich antimykobakteriální aktivita proti MDR/XDR kmenům *M. tuberculosis* je vysoká. U čtyř látek z této série jsme hodnotili jejich antimykotickou a antibakteriální aktivitu *in vitro*. Tyto látky nevykazovali výraznou antimykotickou a antibakteriální aktivitu, což potvrdilo jejich selektivní antimykobakteriální účinek.

Dále jsme připravili deriváty tetrazolu nesoucí nasycený dusíkatý heterocyklus, který umožnil přípravu ve vodě rozpustných solí. Při syntéze derivátu obsahující dvouuhlíkatý spojovací řetězec mezi tetrazolem a nasyceným dusíkatým heterocyklem docházelo ke spontánní eliminaci na vinyl derivát. Antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem závisí na jejich lipofilitě. Lipofilnější deriváty vykazují lepší aktivitu (srovnatelnou či lepší než použitý standard) než méně lipofilní deriváty. Připravené dihydrochloridy si v porovnání s jejich neprotonizovanou formou zachovaly velice dobrou antimykobakteriální aktivitu.

Mimo deriváty tetrazolu jsme také připravili sérii 3,5-dinitrofenyloxadiazolů. K jejich přípravě jsme použili dvě metody. První metodou byla reakce chloridu kyseliny s 5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolem. Přestože je tato reakce v literatuře popsána, v našem případě se nám nepodařilo produkt izolovat. Cílové oxadiazoly jsme získali reakcí hydrazidu s 3,5-dinitrobenzoylchloridem a následným uzavřením oxadiazolového kruhu. Zjistili jsme, že připravené deriváty 1,3,4-oxadiazolu si i přes nepřítomnost síry zachovávají vysokou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*. Především pak derivát **15d** s methylovou skupinou vykazuje v porovnání s isoniazidem několikanásobně lepší aktivitu.

Nakonec jsme připravili derivát oxadiazolu se sírou ve spojovacím řetězci mezi oxadiazolem a nasyceným dusíkatým heterocyklem. Potvrdilo se, že antimykobakteriální aktivita látek tohoto typu je vysoká. Nasycený dusíkatý heterocyklus umožnil přípravu ve vodě rozpustného dihydrochloridu, který v porovnání s jeho neprotonizovanou formou vykazoval taktéž vysokou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

ADME	základní farmakokinetické děje (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece)
ATP	adenosintrifosfát
CLSI	Institut pro klinické a laboratorní standardy
ČNSTK	Česká národní sbírka typových kultur
DIPEA	*N*,*N*-diisopropylethylamin
DMF	*N*,*N*-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DprE1	dekaprenylfosforyl- β -D-ribosa 2'-oxidáza
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Spojené státy americké
CHO-K1	buněčná linie (ovariální buňky čínského křečka)
INH	isoniazid
M. tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MmpL3	transportér trehalóza monomykolátu
MW	mikrovlnná aktivace
NMR	nukleární magnetická rezonance
ppm	parts per milion = miliontina vnějšího pole (jednotka chemického posunu)
R_f	retenční faktor
TB	tuberkulóza

THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TsCl	*p*-toluensulfonylchlorid
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza
5-ST	5-substituované tetrazoly
3T3	buněčná linie (myší embryonální fibroblasty)

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled léčiv doporučovaných pro léčbu MDR-TB 13
Tabulka 2: *In vitro* antimykobakteriální aktivita substituovaných 2- a 1-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů vyjádřená jako MIC [µmol/l] 81
Tabulka 3: *In vitro* antimykobakteriální aktivita vybraných substituovaných 2-benzyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů proti klinicky izolovaným MDR/XDR kmenům M. tuberculosis vyjádřená jako MIC [µmol/l] 82
Tabulka 4: *In vitro* antimykobakteriální aktivita derivátů tetrazolu obsahujících nasycený dusíkatý heterocyklus vyjádřená jako MIC [µmol/l] 83
Tabulka 5: Porovnání *in vitro* antimykobakteriální aktivity (vyjádřena jako MIC v µmol/l) dihydrochloridů 10b a 12b a jejich neprotonizované formy 10a a 12a 83
Tabulka 6: Vliv přítomnosti síry v molekule substituovaných oxadiazolů na jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivitu vyjádřenou jako MIC [µmol/l] 84
Tabulka 7: Porovnání *in vitro* antimykobakteriální aktivity (vyjádřena jako MIC v µmol/l) dihydrochloridu 19b a jeho neprotonizované formy 19a 85
Tabulka 8: Vliv vybraných sloučenin na životaschopnost savčích buněk vyjádřený jako IC_{50} [µmol/l] po 24 hodinách inkubace pro CHO-K1 buňky nebo po 72 hodinách inkubace pro buňky 3T3 86
Tabulka 9: *In vitro* antimykotická aktivita vybraných látek vyjádřená jako MIC [µmol/l] 87
Tabulka 10: *In vitro* antibakteriální aktivita vybraných látek vyjádřená jako MIC [µmol/l] 88

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecný vzorec látek zkoumaných v této práci 7
Obrázek 2: Základní používaná antituberkulotika 12
Obrázek 3: Struktura linezolidu, sutezolidu a AZD5847 16
Obrázek 4: Struktura bedaquilinu 17
Obrázek 5: Struktura PA-824 a delamanidu 17
Obrázek 6: Struktura SQ109 a ethambutolu 18
Obrázek 7: Struktura BTZ043 18
Obrázek 8: Základní struktury dříve připravených derivátů tetrazolu 19
Obrázek 9: Obecná struktura 2,5- a 1,5-disubstituovaných tetrazolů 20
Obrázek 10: Obecná struktura 2,5-disubstituovaných oxadiazolů a thiadiazolů 21
Obrázek 11: Odvození základní struktury připravovaných látek 22
Obrázek 12: Obecná struktura připravovaných 2,5- a 1,5-disubstituovaných tetrazolů 22
Obrázek 13: Obecný vzorec připravovaných derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem 23
Obrázek 14: Struktura ve vodě rozpustných dihydrochloridů 23
Obrázek 15: Obecný vzorec připravovaných derivátů oxadiazolu 23
Obrázek 16: Struktura 2-((3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propyl)sulfanyl)-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolu a jeho dihydrochloridu 24
Obrázek 17: Struktura 2-fenyl-2H-tetrazol-5-karbonitrilu a losartanu 25
Obrázek 18: 5-ST jako bioizosterní náhrada karboxylových kyselin a jejich tautomery 26
Obrázek 19: Struktura amoniové soli 5-ST 29
Obrázek 20: Struktury látek obsahujících oxadiazolový kruh 33
Obrázek 21: Možné regioizomerní formy oxadiazolového kruhu 33
Obrázek 22: Struktura připravovaných 3-fluorbenzyl derivátů 1a a 1b 38
Obrázek 23: Struktura připravovaných 4-methylbenzyl derivátů 2a a 2b 40
Obrázek 24: Struktura připravovaných 3-chlorbenzyl derivátů 3a a 3b 41
Obrázek 25: Struktura připravovaných 3-methoxybenzyl derivátů 4a a 4b 43
Obrázek 26: Obecný vzorec připravovaných derivátů tetrazolu s nasyceným dusíkatým heterocyklem 45
Obrázek 27: Obecný vzorec připravovaných látek 6a a 6b 45
Obrázek 28: Obecný vzorec připravovaných látek 8, 9 a 10a 48
Obrázek 29: Struktura připravované látky 12a 52
Obrázek 30: Obecný vzorec připravovaných látek 15a-d 57

13. POUŽITÁ LETERATURA

1 LAWN, S. D., ZUMLA, A. I. Tuberculosis. *The Lancet.* **2011**, 378(9785), 52-72.

2 Tuberculosis. *World Health Organization.* **2016** [cit. 2017-01-04]. Dostupné z: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/

3 DANIEL, T. M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine.* **2006**, 100(11), 1862-1870.

4 American Thoracic Society: Treatment of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **2003**, 167(4), 603-662.

5 International Standards for Tuberculosis Care (ISTC). *Tuberculosis Coalition for Technical Assistance.* Haag: Tuberculosis Coalition for Technical Assistance**, 2009**

6 WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update: October 2016 revision. *World Health Organization.* Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services, **2016**.

7 ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S. T. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nature Reviews Drug Discovery.* **2013**, 12(5), 388-404.

8 VAN DEUN, A.; MAUG, A. K. J.; SALIM, M. A. H.; et al. Short, Highly Effective, and Inexpensive Standardized Treatment of Multidrug-resistant Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **2010**, 182(5), 684-692.

9 KUABAN, C.; NOESKE, J.; RIEDER, H. L.; AÏT-KHALED, N.; ABENA FOE, J. L.; TRÉBUCQ, A. High effectiveness of a 12-month regimen for MDR-TB patients in Cameroon. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* **2015**, 19(5), 517-524.

10 PIUBELLO, A.; HAROUNA, S. H.; SOULEYMANE, M. B.; BOUKARY, I.; MOROU, S.; DAOUDA, M.; HANKI, Y.; VAN DEUN, A. High cure rate with standardised short-course multidrug-resistant tuberculosis treatment in Niger: no relapses. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* **2014**, 18(10), 1188-1194.

11 NUNN, A. J.; RUSEN, I. D.; VAN DEUN, A.; et al. Evaluation of a standardized treatment regimen of anti-tuberculosis drugs for patients with multi-drug-resistant tuberculosis (STREAM): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* **2014**, 15(353).

12 Tuberculosis. *World Health Organization.* **2016** [cit. 2017-01-14]. Dostupné z: http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/treatment/en/

13 MA, Z.; LIENHARDT, C.; MCILLERON, H.; NUNN, A. J.; WANG, X. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality. *Lancet.* **2010**, 375(9731), 2100-2109.

14 ROSENTHAL, I. M.; ZHANG, M.; WILLIAMS, K. N.; PELOQUIN, C. A.; TYAGI, S.; et al. Daily Dosing of Rifapentine Cures Tuberculosis in Three Months or Less in the Murine Model. *PLoS Medicine.* **2007**, 4(12): e344, 1931-1939.

15 Tuberculosis. *World Health Organization.* **2015** [cit. 2017-01-15]. Dostupné z: http://www.who.int/tb/features_archive/essential_medicines_2015/en/

16 FORTUN, J.; et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **2005**, 56(1), 180-185.

17 LEE, M.; LEE, J.; CARROLL, M. W.; et al. Linezolid for Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. **2012**, 367(16), 1508-1518.

18 WALLIS, R. S.; JAKUBIEC, W. M.; KUMAR, V.; et al. Biomarker-Assisted Dose Selection for Safety and Efficacy in Early Development of PNU-100480 for Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2011**, 55(2), 567-574.

19 WALLIS, R. S.; JAKUBIEC, W. M.; KUMAR, V.; et al. Pharmacokinetics and Whole-Blood Bactericidal Activity against Mycobacterium tuberculosis of Single Doses of PNU-100480 in Healthy Volunteers. *The Journal of Infectious Diseases.* **2010**, 202(5), 745-751.

20 OLARU, I. D.; VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F.; HEYCKENDORF, J.; YEW, W. W.; LANGE, C.; CHANG, K. C. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *European Respiratory Journal.* **2015**, 45(4), 1119-1131.

21 BALASUBRAMANIAN, V.; SOLAPURE, S.; IYER, H.; et al. Bactericidal Activity and Mechanism of Action of AZD5847, a Novel Oxazolidinone for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2013**, 58(1), 495-502.

22 MAHAJAN, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *International Journal of Applied and Basic Medical Research.* **2013**, 3(1), 1-2.

23 VEZIRIS, N.; IBRAHIM, M.; LOUNIS, N.; CHAUFFOUR, A.; TRUFFOT-PERNOT, C.; ANDRIES, K.; JARLIER, V. A Once-Weekly R207910-containing Regimen Exceeds Activity of the Standard Daily Regimen in Murine Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* **2009**, 179(1), 75-79.

24 LOUNIS, N.; GEVERS, T.; VAN DEN BERG, J.; VERHAEGHE, T.; VAN HEESWIJK, R.; ANDRIES, K. Prevention of Drug Carryover Effects in Studies Assessing Antimycobacterial Efficacy of TMC207. *Journal of Clinical Microbiology.* **2008**, 46(7), 2212-2215.

25 COHEN, J. Approval of Novel TB Drug Celebrated--With Restraint. *Science.* **2013**, 339(6116), 130.

26 SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H. I. M.; et al. PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science.* **2008**, 322(5906), 1392-1395.

27 LEE, R. E.; PROTOPOPOVA, M.; CROOKS, E.; SLAYDEN, R. A.; TERROT, M.; BARRY, C. E. Combinatorial Lead Optimization of [1,2]-Diamines Based on Ethambutol as Potential Antituberculosis Preclinical Candidates. *Journal of Combinatorial Chemistry.* **2003**, 5(2), 172-187.

28 PASCA, M. R.; DEGIACOMI, G.; RIBEIRO, A. L. d. J. L.; et al. Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis in Four European Hospitals Are Uniformly Susceptible to Benzothiazinones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **2010**, 54(4), 1616-1618.

29 MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUSOVA, K.; et al. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science.* **2009**, 324(5928), 801-804.

30 KARABANOVICH, G.; ROH, J.; SMUTNÝ, T.; et al. 1-Substituted-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazoles and their isosteric analogs: A new class of selective antitubercular agents active against drug-susceptible and multidrug-resistant mycobacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2014**, 82, 324-340.

31 KARABANOVICH, G.; ROH, J.; SOUKUP, O.; et al. Tetrazole regioisomers in the development of nitro group-containing antitubercular agents. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6(1), 174-181.

32 KARABANOVICH, G.; ZEMANOVÁ, J.; SMUTNÝ, T.; et al. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2016**, 59(6), 2362-2380.

33 BLADIN, J. A. Ueber von Dicyanphenylhydrazin abgeleitete Verbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* **1885,** *18*, 1544-1551.

34 CARINI, D. J.; DUNCIA, J. V.; ALDRICH, P. E.; et al. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the discovery of a series of N-(biphenylylmethyl)imidazoles as potent, orally active antihypertensives. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1991**, 34(8), 2525-2547.

35 MARSHALL, W. S.; GOODSON, T.; CULLINAN, G. J.; SWANSON-BEAN, D.; HAISCH, K. D.; RINKEMA, L. E.; FLEISCH, J. H. Leukotriene receptor antagonists. 1. Synthesis and structure-activity relationships of alkoxyacetophenone derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1987**, 30(4), 682-689.

36 MYZNIKOV, L. V.; HRABALEK, A.; KOLDOBSKII, G. I. Drugs in the tetrazole series. (Review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* **2007**, 43(1), 1-9.

37 HERR, R. J. 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2002**, 10(11), 3379-3393.

38 FINNEGAN, W. G.; HENRY, R. A.; LOFQUIST, R. An Improved Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles. *Journal of the American Chemical Society.* **1958**, 80(15), 3908-3911.

39 ROH, J.; VÁVROVÁ, K.; HRABÁLEK, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. *European Journal of Organic Chemistry.* **2012**, 2012(31), 6101-6118.

40 KOGURO, K.; OGA, T.; MITSUI, S.; ORITA, R. Novel Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles from Nitriles. *Synthesis.* **1998**, 1998(06), 910-914.

41 ROH, J.; ARTAMONOVA, T.; VÁVROVÁ, K.; KOLDOBSKII, G.; HRABÁLEK, A. Practical Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles under Microwave Irradiation. *Synthesis.* **2009**, 2009(13), 2175-2178.

42 DEMKO, Z. P.; SHARPLESS, K. B. Preparation of 5-Substituted 1 H -Tetrazoles from Nitriles in Water . *The Journal of Organic Chemistry.* **2001**, 66(24), 7945-7950.

43 ETTENHUBER, E.; RÜHLMANN, K. Über die Si-N-Bindung, XXVIII. Umsetzungen mit Azidosilanen. *Chemische Berichte.* **1968**, 101(2), 743-750.

44 DUNCIA, J. V.; PIERCE, M. E.; SANTELLA, J. B. Three synthetic routes to a sterically hindered tetrazole. A new one-step mild conversion of an amide into a tetrazole. *The Journal of Organic Chemistry.* **1991**, 56(7), 2395-2400.

45 SISIDO, K.; NABIKA, K.; ISIDA. T.; KOZIMA, S. Formation of organotin---nitrogen bonds III. N-trialkyltin-5-substituted tetrazoles. *Journal of Organometallic Chemistry.* **1971**, 33(3), 337-346.

46 OSTROVSKII, V. A.; KOREN, A. O. Alkylation and Related Electrophilic Reactions at Endocyclic Nitrogen Atoms in the Chemistry of Tetrazoles. *HETEROCYCLES.* **2000**, 53(6), 1421-1448.

47 TITOVA, I. E.; POPLAVSKII, V. S.; OSTROVSKII, V. A.; ERUSALIMSKII, G. B.; TERESHCHENKO, G. F.; KOLDOBSKII, G. I. Tetrazoles. XXII. Kinetics of the reaction of the triethylammonium salt of 5-phenyltetrazole with methyl vinyl ketone. *Zh. Org. Khim*. **1987,** 23(5), 1082-1086.

48 (a) KOLDOBSKII, G. I.; OSTROVSKII, V. A. Acid-Base Properties of 5-Membered Nitrogen-Heterocycles. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1988,** 579-592. (b) MO, O.; DE PAZ, J. L. G.; YANEZ, M. Protonation Energies and Tautomerism of Azoles. Basis Set Effects. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90,* 5597-5604. (c) OSTROVSKII, V. A.; ERUSALIMSKII, G. B.; SHCHERBININ, M. B. Study of 5-membered Nitrogenous Heterocycles via Quantum-Chemistry Methods .1. Acid-Base Properties of Azoles. *Zh. Org. Khim*. **1993**, *29(7),* 1297-1302.

49 KOREN', A. O.; GAPONIK, P. N. Selective $N_{(2)}$ alkylation of tetrazole and 5-substituted tetrazoles by alcohols. *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* **1990**, 26(12), 1366-1370.

50 JAMES, N. D.; GROWCOTT, J. W. Zibotentan. *Drugs of the Future.* **2009**, 34(8), 624-633.

51 JONES, A. M.; HELM, J. M. Emerging Treatments in Cystic Fibrosis. *Drugs.* **2009**, 69(14), 1903-1910.

52 SUMMA, V.; PETROCCHI, A.; BONELLI, F.; et al. Discovery of Raltegravir, a Potent, Selective Orally Bioavailable HIV-Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-AIDS Infection. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2008**, 51(18), 5843-5855.

53 JONES, R. M.; LEONARD, J. N.; BUZARD, D. J.; LEHMANN, J. GPR119 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* **2009**, 19(10), 1339-1359.

54 LEE, S. H.; SEO, H. J.; LEE, S. H.; JUNG, M. E.; et al. Biarylpyrazolyl Oxadiazole as Potent, Selective, Orally Bioavailable Cannabinoid-1 Receptor Antagonists for the Treatment of Obesity. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2008**, 51(22), 7216-7233.

55 UNANGST, P. C.; SHRUM, G. P.; CONNOR, D. T.; DYER, R. D.; SCHRIER, D. J. Novel 1,2,4-oxadiazoles and 1,2,4-thiadiazoles as dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1992**, 35(20), 3691-3698.

56 COTTRELL, D. M.; CAPERS, J.; SALEM, M. M.; DeLUCA-FRADLEY, K.; CROFT, S. L.; WERBOVETZ, K. A. Antikinetoplastid activity of 3-aryl-5-thiocyanatomethyl-1,2,4-oxadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **2004**, 12(11), 2815-2824.

57 BOSTRÖM, J.; HOGNER, A.; LLINÀS, A.; WELLNER, E.; PLOWRIGHT, A. T. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2012**, 55(5), 1817-1830.

58 MODERHACK, D. Ring Transformations in Tetrazole Chemistry. *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung.* **1998**, 340(8), 687-709.

59 NĚMEČEK, J.; SYCHRA, P.; MACHÁČEK, M.; et al. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, 130, 419-432.

14. PŘÍLOHY

14.1 Publikace v odborném časopise

NĚMEČEK, J.; SYCHRA, P.; MACHÁČEK, M.; et al. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2017**, 130, 419-432.

14.2 Národní patentový spis

UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituovaný fenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Původci: ROH, J.; NĚMEČEK, J.; HRABÁLEK, A.; KLIMEŠOVÁ, V.; KARABANOVICH, G.; PÁVEK, P.; SYCHRA, P. IPC: C07D257/04, A61K31/41, A61P31/06. Česká republika. Patentový spis CZ 306245 B6. 14.09.2016.

14.3 Mezinárodní patentová přihláška PCT:

UNIVERZITA KARLOVA, FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ. Substituted phenyltetrazole, its use and pharmaceutical preparation containing it. Inventors: ROH, J.; NĚMEČEK, J.; HRABÁLEK, A.; KLIMEŠOVÁ, V.; KARABANOVICH, G.; PÁVEK, P.; SYCHRA, P. IPC: C07D257/04, A61K31/41, A61P31/06. World Intellectual Property Organization. International application (PCT), App. Num. PCT/CZ2015/000126, Publ. Num. WO 2016/091228 A1.16.06.2016.