

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



**Oxadiazoly jako potenciální léčiva**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2016

Pavλίna Dzámová

*Tímto prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá použitá literatura a další zdroje, ze kterých jsem během psaní diplomové práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.*

**Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV 260 291.**

*V první řadě bych chtěla poděkovat PharmDr. M. Kučerové, Ph.D. za její vstřícnost a ochotu, velkou pomoc a cenné rady, které mi poskytla při tvorbě této práce.*

*Dále děkuji paní doc. RNDr. V. Opletalové, Ph.D. za odborné rady, paní H. Hronové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření a následnou interpretaci NMR spekter; doc. RNDr. V. Buchtovi, CSc. a paní I. Dufkové za testování biologické aktivity; Mgr. O. Jand'ourkovi za testování antituberkulotické aktivity proti *Mycobacterium smegmatis*.*

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Kandidát:** Džámová Pavlína

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

**Název diplomové práce:** Oxadiazoly jako potenciální léčiva

Vzhledem ke vzrůstající rezistenci mikroorganismů proti běžně používaným léčivům, je přímo nezbytné najít a vyvinout nová antibakteriální a antifungální léčiva. V teoretické části této diplomové práce jsem se zaměřila na biologické účinky 1,2,4-oxadiazolů, které jsou známy jako látky s velmi slibnou budoucností. Jsou to významné heterocyklické sloučeniny s různou biologickou aktivitou. Mohou působit jako inhibitory tyrosin-kinasy, agonisté muskarinových receptorů, antagonisté histaminových H<sub>3</sub> receptorů, protizánětlivé, protirakovinné, antimikrobní látky a mohou inhibovat monoaminoxidasy.

Metodická část shrnuje nejdůležitější postupy pro přípravu 1,2,4-oxadiazolů.

V experimentální části této studie bylo syntetizováno šest nových derivátů 1,2,4-oxadiazolu. Tyto deriváty byly získány cyklizací odpovídajících pyrazin-2-karboximidamidů s acetanhydridem za vzniku 5-methyl-3-pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazolů různě alkylovaných na pyrazinovém jádře v poloze 5. Výchozí látky pro cyklizaci byly k dispozici, ev. byly připraveny radikálovou alkylací pyrazinkarbonitrilu a převedením na příslušný amidoxim hydroxylamin-hydrochloridem.

Žádná z těchto sloučenin dosud nebyla popsána. Byly charakterizovány teplotou tání, IR a NMR spektry. Jejich čistota byla zkontrolována pomocí TLC a elementární analýzy.

Látky byly testovány *in vitro* na antifungální a antibakteriální aktivitu. Proti vybraným kmenům hub a bakterií (včetně *Mycobacterium smegmatis*) byla aktivita žádná nebo slabá.

## **Abstract**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Candidate:** Pavlína Džámová

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

**Title of diploma thesis:** Oxadiazoles as Potential Drugs

Due to the increasing resistance of bacteria and fungi against conventional drugs, it is imperative to design and develop new antibacterial or antifungal agents. In the theoretical part of this diploma thesis, I focused on the biological activities of 1,2,4-oxadiazoles, that are known as the compounds with promising future in this direction. They are very important heterocyclic compounds with various bioactivities, such as tyrosine kinase inhibition, muscarinic agonism, histamine H<sub>3</sub> antagonism, anti-inflammatory, antitumoral, antimicrobial and monoamine oxidase inhibition.

Methodical part resumes the most important procedures for the preparation of 1,2,4-oxadiazoles.

In the experimental part of this study, six new oxadiazole derivatives have been synthesized. 5-Methyl-3-pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazoles variably alkylated in position 5 of the pyrazine ring resulted from cyclization of corresponding pyrazin-2-carboximidamides with acethanhydride. Starting compounds for cyclization were available in our laboratory. In case of absence, they were prepared by radical alkylation of pyrazincarbonitrile and by subsequent transformation to corresponding amidoximes with hydroxylamine hydrochloride.

None of these compounds have been reported yet. They have been characterized by melting points, IR and NMR spectra. Their purity was checked by TLC and elemental analysis.

The compounds were tested *in vitro* for their antifungal and antibacterial activity. They have weak or no inhibition effect against the selected strains of fungi and bacteria including *Mycobacterium smegmatis*.

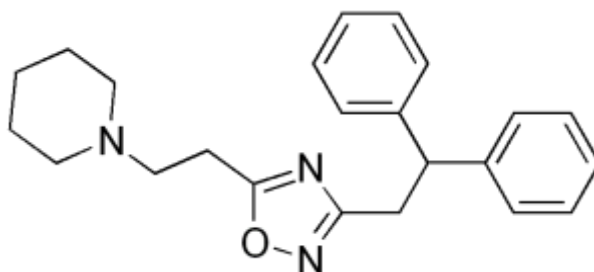
## Obsah

1. Úvod a cíl práce .....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1 Antimikrobní účinky oxadiazolů .....	8
2.1.1 Antibakteriální účinky .....	10
2.1.2 Antituberkulotické účinky .....	15
2.1.3 Antifungální účinky .....	18
2.2 Další biologické účinky .....	21
2.2.1 Antiprotozoální účinky .....	21
2.2.2 Anti-astmatické účinky .....	22
2.2.3 Protirakovinné účinky .....	23
2.2.4 Přírodní látky s oxadiazolem .....	25
3. Metodická část .....	27
4. Experimentální část .....	31
4.1 Chemická část .....	31
4.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů .....	32
4.1.2 Příprava <i>N'</i> -hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů .....	33
4.1.3 Příprava 3-(5-alkylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazolů .....	34
4.2 Biologická část .....	42
4.2.1 Hodnocení antifungální aktivity .....	42
4.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity .....	44
4.2.3 Hodnocení antituberkulotické aktivity .....	46
5. Diskuze .....	48
6. Závěr .....	50
7. Literatura .....	51

# 1. Úvod a cíl práce

Na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové má výzkum sloučenin s pyrazinovým jádrem bohatou historii [1]. V roce 2011 popsala a syntetizovala Horká ve své diplomové práci řadu derivátů pyrazinamidoximů. Tyto sloučeniny byly poté testovány na potenciální antibakteriální a antifungální účinky [2]. Výše uvedené amidoximy jsou intermediáty pro syntézu 1,2,4-oxadiazolů [3]. Dále jsou deriváty pyrazinkarbonitrilu, potenciálního antituberkulotika připraveného již v 50. letech 20. století [4] a jeho odpovídající 5-alkylované deriváty využívány k přípravě odpovídajících 1-pyrazin-2-yl-ethanonů [5,6], chalkonů [7-10], thiosemikarbazonů [11] a dalších.

V této diplomové práci jsem se věnovala syntéze 1,2,4-oxadiazolů, které mají velmi slibnou budoucnost v oblasti farmaceutické chemie. Tento heterocykl obsahují již známá, klinicky používaná léčiva. Jedná se např. o antitusikum **prenoxdiazin**, který momentálně není na trhu v ČR registrován [12].



**Prenoxdiazin**

U látek s tímto heterocyklem byly zjištěny velmi rozmanité biologické účinky. Mezi tyto aktivity patří např. účinek analgetický, antirhinovirální, antioxidační, protizánětlivý, anti-astmatický, protirakovinný, antifungální, antimykobakteriální, antiprotozoální, antibakteriální aj. [13].

Cílem mé diplomové práce byla syntéza 3,5-disubstituovaných-1,2,4-oxadiazolů pomocí cyklizace příslušných *N'*-hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů. Po úspěšné syntéze a identifikaci byly tyto látky podrobeny *in vitro* testování na antifungální a antibakteriální účinky vůči vybraným druhů hub a bakterií.

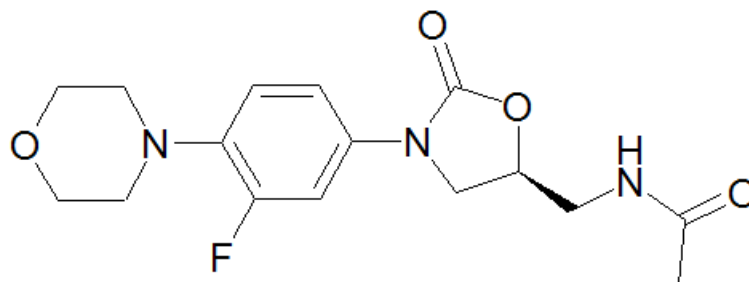
## 2. Teoretická část

### 2.1 Antimikrobní účinky oxadiazolů

Alarmující rychlostí přibývá případů multilékové rezistence různých druhů patogenů, např. v nemocničním prostředí, vlivem migrace aj. Proto je velmi důležité zaměřit se na výzkum a syntézu nových účinných léčiv. Např. mezi léty 1940 a 1970 byla objevena v rámci farmaceutického průmyslu řada nových látek s rozdílným mechanismem účinku. Bohužel i účinnost těchto látek v dnešní době rapidně klesá.

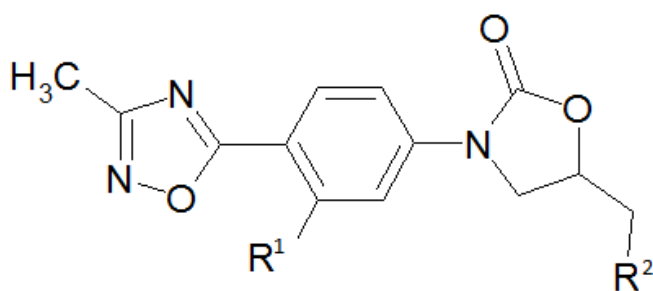
Nabízí se více řešení problému lékové rezistence. Jedním z nich je objevení nových, dosud nepopsaných léčiv s novým mechanismem účinku. Jako druhé řešení se nabízí syntetická obměna léčiv stávajících. Druhým přístupem se zabývali Piccionello a kolektiv [18]. Syntetizovali řadu oxadiazolových derivátů známé antibakteriální látky **linezolidu**. Toto antibakteriální agens bylo v roce 2000 schváleno FDA pro léčbu nozokomiální pneumonie, komplikovaných i nekomplikovaných infekcí kůže a měkkých tkání, infekcí způsobených methicilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA) [14-16]. Tato látka se váže na 50S část ribozomu, čímž zabraňuje tvorbě funkčního iniciačního komplexu 70S nutného pro syntézu bílkovin [17]. Bohužel i na tuto látku se začala objevovat rezistence. Výzkum ukázal, že přítomnost oxazolidinonu není nezbytná pro antibiotickou aktivitu linezolidu, proto bylo možné provést strukturální modifikace i v této části molekuly. Bohužel se tyto různé strukturální modifikace ukázaly jako neúčinné a testování těchto sloučenin proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriálním patogenům potvrdilo jejich slabý nebo žádný antibakteriální účinek proti testovaným kmenům. I přes známou skutečnost, že 1,2,4-oxadiazolový kruh je izosterický s oxazolidinonem, se můžeme domnívat, že slabá aktivita těchto látek může být způsobena právě heteroaromatickým kruhem, který může ovlivňovat buněčnou absorpci [18].





**Linezolid**

Další strukturální modifikace linezolidu se objevily i ve výzkumu, který prováděli Fortuna a spol. Syntetizovali řadu derivátů výměnou morfolinového nebo piperazinového kruhu za 1,2,4-oxadiazol. Tímto krokem došlo dokonce ke zvýšení antibakteriální aktivity a to konkrétně proti gram-pozitivním multirezistentním patogenům. Byly *in vitro* testovány enantiomery *R* a *S*. Ve výsledku byla aktivita (*S*)-1-((3-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)fenyl)-oxazolidin-2-on-5-yl)methyl)-3-methylthiourey a (*S*)-1-((3-(3-fluor-4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)fenyl)-oxazolidin-2-on-5-yl)methyl)-3-methylthiourey dokonce vyšší než u samotného linezolidu a cytotoxicita byla naopak nižší [19].



$R^1 = H$  nebo  $R^1 = F$

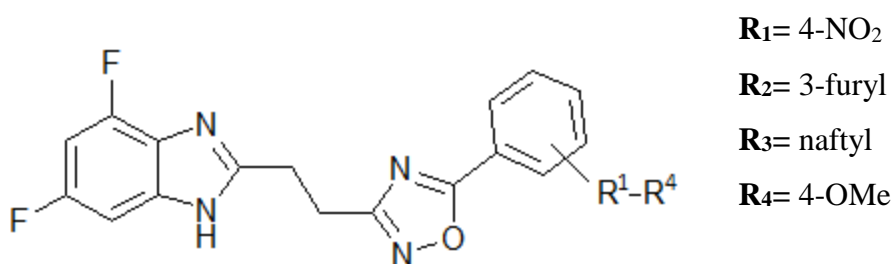
$R^2 = NHC(=S)NH_2$  nebo

$R^2 = NHC(=S)NHCH_3$

**Deriváty linezolidu s oxadiazolem a methylthioureu**

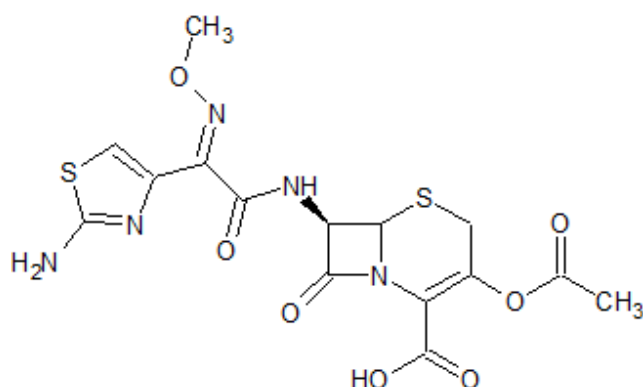
### 2.1.1 Antibakteriální účinky

Oxadiazolový kruh je znám jako významný protimikrobní činitel, proto je mu věnována pozornost v mnoha studiích. Jadhav a kolektiv se rozhodli spojit protimikrobní účinek 1,2,4-oxadiazolů s fluorbenzimidazolem. *In vivo* farmakodynamický účinek oxadiazolů je navýšen díky jejich hydrolytické a metabolické stabilitě. Autoři syntetizovali nové deriváty difluorbenzimidazolu s různě substituovanými 5-fenyl-1,2,4-oxadiazoly. Následně byly tyto sloučeniny testovány *in vitro* proti dvěma gram-pozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) a gram-negativním (*E. coli*, *Salmonella typhosa*) bakteriím. Některé ze sloučenin vykazovaly lepší aktivitu proti výše zmíněným gram-pozitivním, některé byly účinnější proti gram-negativním. Pro příklad jsou uvedeny čtyři látky, které měly střední protimikrobní aktivitu: [20]

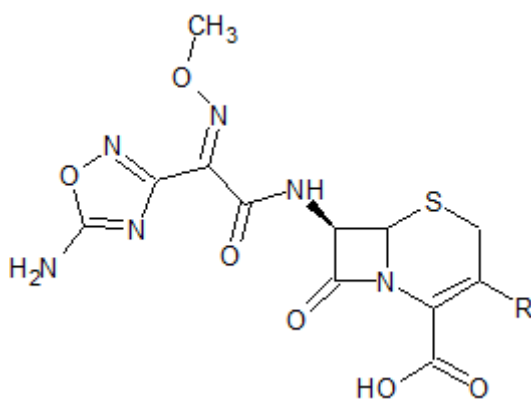


#### Deriváty 1,2,4-oxadiazolu substituované difluorbenzimidazolem

Jednou z modifikací již stávajících antibakteriálních látek je syntéza derivátů ze skupiny cefalosporinů, konkrétně **7β-[2-(5-amino-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-2-Z-methoximinoacetamido]cefalosporinu**. Tyto látky byly poté testovány *in vitro* agarovou diluční metodou. Jako referenční látka byl použit **cefotaxim**. Většina látek byla neaktivní proti *Pseudomonas aeruginosa*, přičemž cefotaxim má proti němu mírnou aktivitu. Avšak skvělou aktivitu mají látky proti *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumonia* a *Haemophilus influenzae* [21].



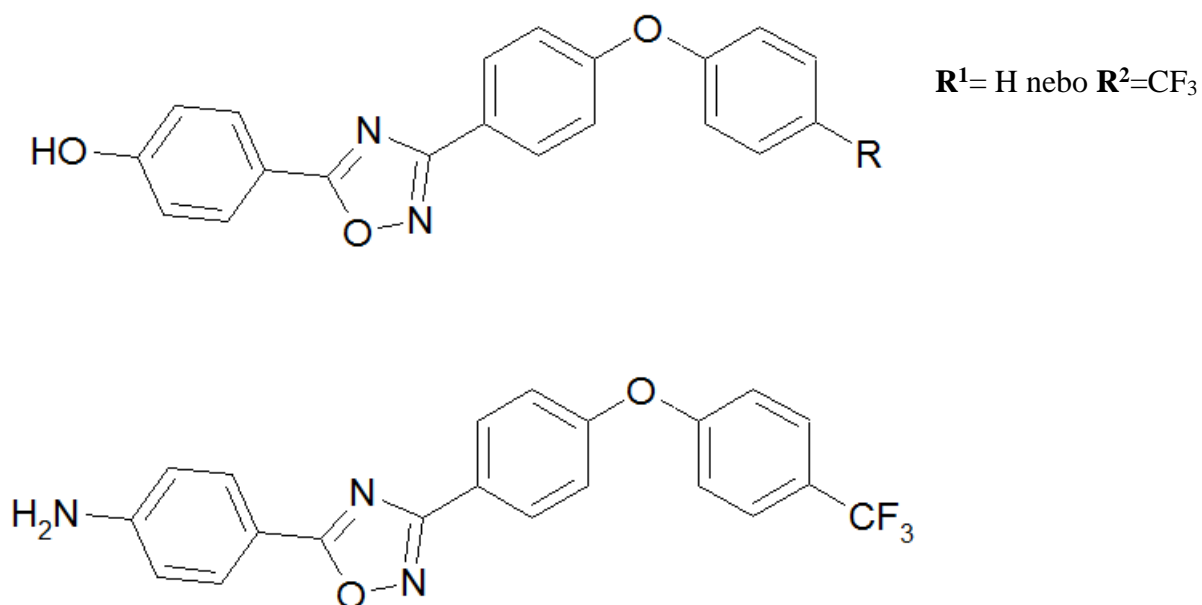
**Cefotaxim**



**Deriváty cefalosporinu s 1,2,4-oxadiazolem**

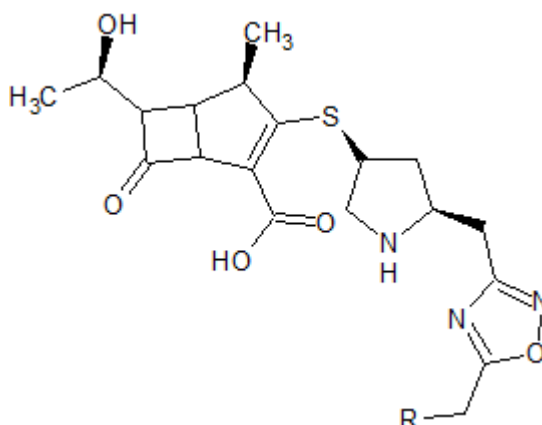
Infekce způsobené meticilin-rezistentním *Staphylococcus aureus* jsou vážným globálním problémem. Došlo ke zvýšení výskytu MRSA infekcí z 2% incidence v roce 1974 na 64% incidence v roce 2004. Vždy byly lékem volby  $\beta$ -laktamová antibiotika, ačkoliv jejich použití se již v roce šedesátých letech dvacátého století bralo v této indikaci za obsolentní. V současné době jsou jedinými používanými léčivy vankomycin, daptomycin a linezolid, z čehož pouze linezolid se dá aplikovat perorálně. Je velmi nutné objevit nové látky, které by měly po perorálním podání dostatečný účinek a nízkou toxicitu. O'Daniel a kolektiv přišli s řadou nových derivátů 1,2,4-oxadiazolu, u nichž zjistili výbornou biodostupnost po perorálním podání. Domnívají se, že mechanismus účinku těchto látek spočívá v inhibici tzv. penicillin-binding proteinu 2a (PBP2a). Tudíž zasahují do syntézy peptidoglykanu v buněčné stěně bakterií. Nepodílejí se na inhibici transkripce, translace nebo replikace. Všechny sloučeniny byly testovány *in vitro* proti

různým bakteriálním kmenům a i *in vivo* u myši, kde byla zjištěna jejich 100% orální biodostupnost [22].



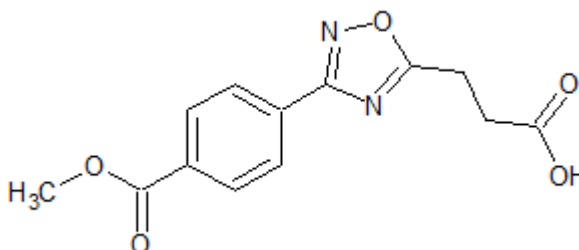
#### Příklady derivátů syntetizovaných O'Danielem a kolektivem [22]

Karbapenemy jsou látky s antibakteriální aktivitou, které se užívají hlavně u hospitalizovaných pacientů. Používají se především proti multirezistentním bakteriím. Řadí se mezi  $\beta$ -laktamová antibiotika, jejichž mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny [23]. Oh a spol popsali syntézu a biologickou aktivitu 1 $\beta$ -methylkarbapenemů s 5'-substituovanou oxadiazolymethylpyrrolidin-3-ylsulfanylovou skupinou. Následně byla testována jejich *in vitro* aktivita proti gram-negativním i gram-pozitivním bakteriím. Přišli na to, že největší antibakteriální aktivitu, srovnatelnou s referenčním imipenemem a meropenemem, mají deriváty s oxadiazolem substituovaným esterovou nebo amidovou funkční skupinou [24].



### Deriváty karbapenemu s 1,2,4-oxadiazolem

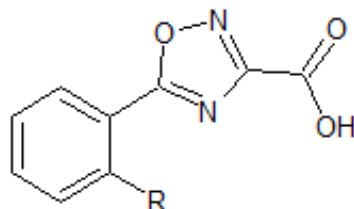
Bylo zjištěno, že 1,2,4-oxadiazoly obsahující substituovaný aryl nebo alkyl v poloze 5 mají velmi slibné antibakteriální a antifungální účinky. Tuto skutečnost ve svém výzkumu potvrdili Tale a kolektiv. Syntetizovali řadu derivátů, z nichž největší antibakteriální aktivitu měl uvedený **derivát**, v jehož molekule se nachází dvouuhlíkatý spojovací řetězec mezi aromatickou částí a karboxylovou kyselinou. Nejslibnější účinek měla tato látka proti *Bacillus subtilis* [25].



### Derivát syntetizovaný Tale a kolektivem s nejvyšší aktivitou

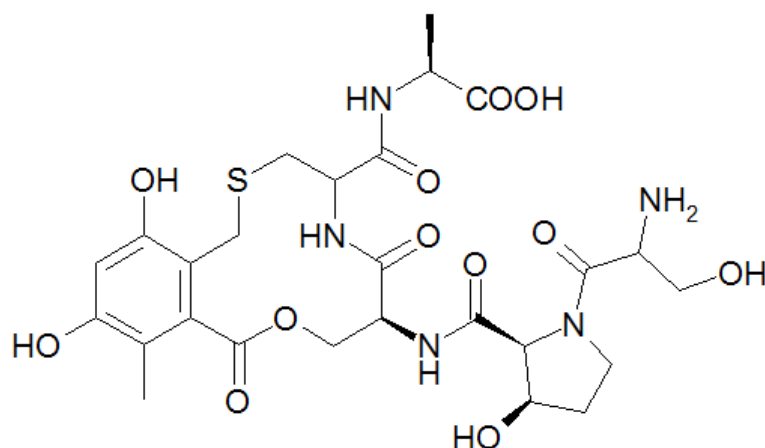
Jedním ze způsobů zastavení buněčného růstu je i zásah do biochemických reakcí potřebných k jejímu přežití, jako např. NME, což je N-terminální vymazání methioninu. U prokaryotních organismů jsou všechny vznikající polypeptidové řetězce zakončené N-formylmethioninovým zbytkem. Pro úspěšné odštěpení terminálního N-methioninu a formylové skupiny jsou třeba dva enzymy – peptid-deformylasa a methionin-aminopeptidasa (MetAP). Vymazání genu, který kóduje MetAP se ukázalo jako letální pro *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Methionin-aminopeptidasa je enzym ze skupiny metaloproteas, které jsou aktivovány bivalentními kationty, jako např.

kobaltnatými, nikelnatými, zinečnatými, železnatými nebo manganatými. Huguet a spol. proto navrhli řadu derivátů, včetně sloučenin s 1,2,4-oxadiazolem, jako možných inhibitorů železnatých a manganatých forem MetAP u *Escherichia coli*. Zkoušené **5-aryl-1,2,4-oxadiazol-3-karboxylové kyseliny** vykázaly slabou aktivitu proti všem formám tohoto enzymu [26].



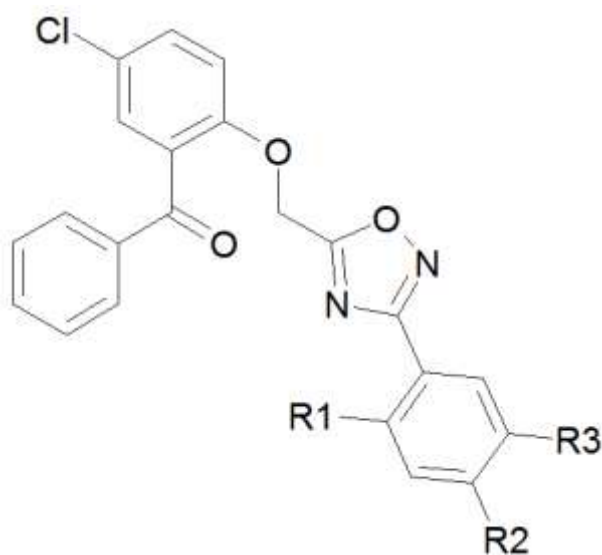
### 5-aryl-1,2,4-oxadiazol-3-karboxylová kyselina

Jeden mechanismus antibakteriálního účinku spočívá v inhibici DNA-gyrasy, což je enzym nutný k rozštěpení dvoušroubovice DNA. Mezi inhibitory tohoto enzymu patří kumarinová antibiotika a chinolony. Druhé zmíněné zaujímají významnou pozici v terapii bakteriálních onemocnění. Inhibitorem DNA-gyrasy izolovaným z *Streptomyces filipinensi* je **cyklothialidin**. Ten se váže na B podjednotku tohoto enzymu. Skládá se z dvanácti-členného laktonového kruhu, který je spojen s vysoce substituovaným benzenovým jádrem a částečně včleněný do pentapeptidového řetězce. Tato sloučenina nabízí mnoho strukturních modifikací a právě tímto se zabývali Angehrn a kolektiv. Syntetizovali mnoho nových derivátů cyklothialidinu, které následně nechali testovat pro jejich potenciální antibakteriální aktivitu. Některé z nich měly ve struktuře, konkrétně na laktonový kruh, zabudovaný 1,2,4-oxadiazol. Čím byly syntetizované sloučeniny lipofilnější, tím měly vyšší efekt i proti gram-pozitivním bakteriím [27].



### Cyklothialidin

Rai a kolektiv navrhli a syntetizovali řadu derivátů **{5-chlor-2-[(3-(subst.fenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-methoxy]-fenyl}-(fenyl)-methanonu**. Byla objevena rozdílná antibakteriální účinnost u jednotlivých derivátů. Testovanými kmeny byly *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae*. Fenyl, který nesl skupiny jako chlor, fluor, jód, methyl, methoxy, ethoxy a isopropyl, byl připojen k oxadiazolovému kruhu. Jako nejúčinnější se jevila sloučenina se dvěma substituovanými fluory a jedním methylem [28].

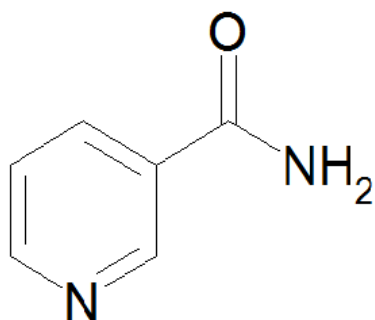


**{5-chlor-2-[(3-(subst.fenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-methoxy]-fenyl}-(fenyl)-methanon**

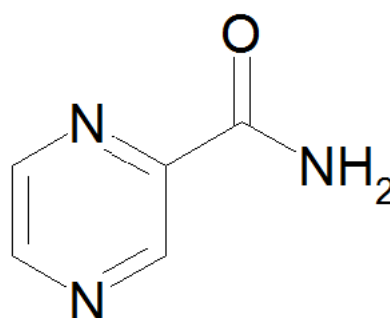
### 2.1.2 Antituberkulotické účinky

Tuberkulóza je celosvětově velkou příčinou morbidity a mortality. Toto infekční onemocnění je způsobeno patogenní bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Každý rok této bakterii podlehnou přes jeden milion lidí. Mezi běžně používaná antibiotika první řady patří isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol. I přes velkou úspěšnost léčby, tj. 85 %, se stále zvětšuje rezistence mykobakterií na tyto látky. Samozřejmě se v druhé řadě dají použít i méně užívaná antibiotika, ty se ale pacientům moc nepodávají kvůli svým vedlejším účinkům a toxicitě. Proto je také v dnešní době vynaloženo velké úsilí na objevení nových účinných látek či modifikování struktury již zavedených léčiv [29].

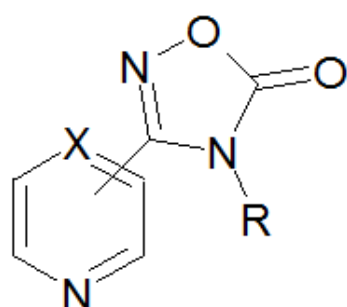
Gezginci a kolektiv zkoumali antituberkulotickou aktivitu 1,2,4-oxadiazol-5-onu a 1,2,4-oxadiazole-5-thionu jako isostery **nikotinamidu** a **pyrazinamidu**. Připravili **deriváty pivaloyloxymethylu** těchto isosterů za účelem zvýšení lipofility a zlepšení buněčné permeability. Tyto isostery se po průchodu buněčnou stěnou mykobakterie transformovaly příslušnými esterasami na aktivní sloučeniny. Většina těchto sloučenin měla potenciál pyrazinamidu v rozsahu 0,5 až 16 % [30].



**Nikotinamid**

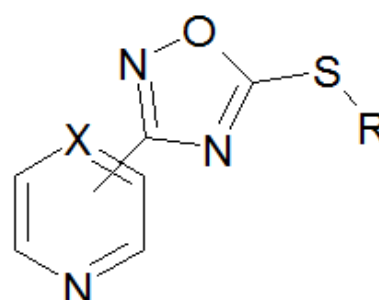


**Pyrazinamid**



**R**= pivaloyloxymethyl

**X**= N, CH

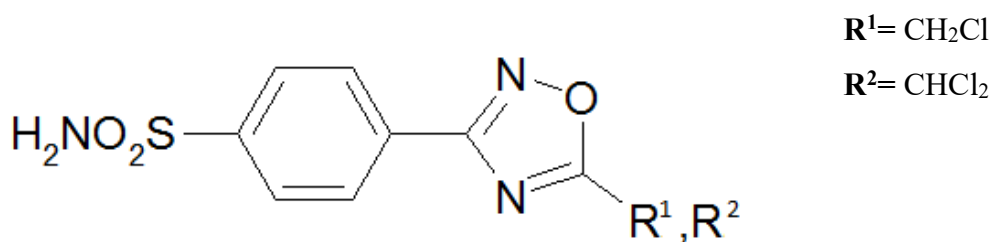


### **Příklady derivátů s pivaloyloxymethylem**

Pancechowska-Ksepko a kolektiv se věnovali tuberkulostatické aktivitě sérii derivátů **3-pyrazinyl-1,2,4-oxadiazolu**. Některé z těchto sloučenin vykazovaly vyšší aktivitu oproti ostatním derivátům. Aktivita byla testována proti určitým kmenům, která jsou rezistentní na běžně používaná léčiva [31].

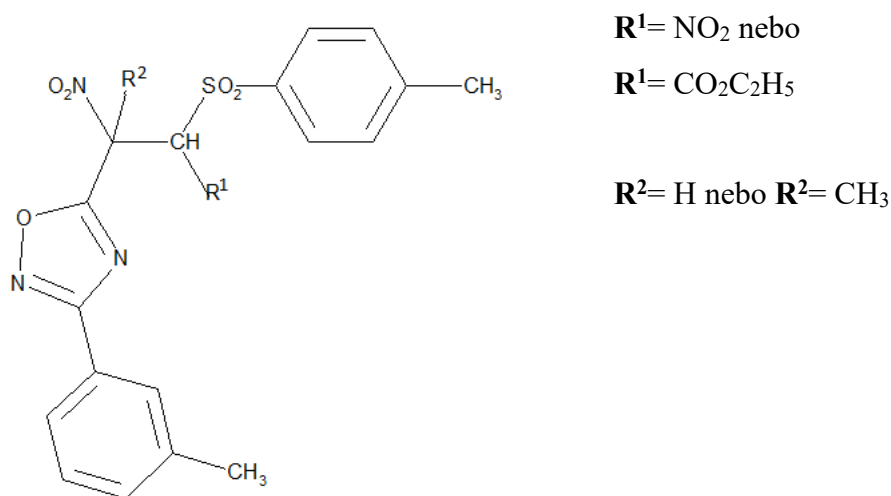


Antituberkulotické účinky se projevily i u derivátů 5-chlormethyl a 5-dichlormethyl-3-(*p*-sulfonamidofenyl)-1,2,4-oxadiazolu, kterým se věnoval Ernst a kolektiv [32].



#### Deriváty syntetizované Ernstem a kolektivem

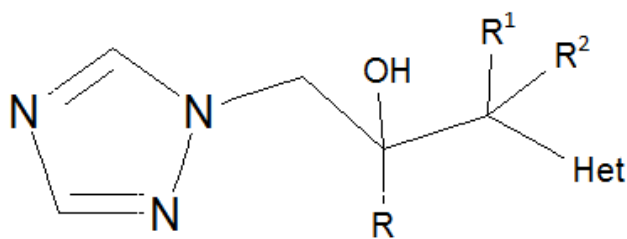
Tyrkov a kolektiv syntetizovali řadu substituovaných **2-nitro-1-(4-tolylsulfonyl)-2-(3-methylfenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethanů**, které následně nechali testovat proti *Mycobacterium lufu* a *Mycobacterium tuberculosis*. Referenčními látkami byli isoniazid a dapson. Aktivita některých sloučenin byla *in vitro* srovnatelná s isoniazidem. Dále zkoumali i akutní toxicitu syntetizovaných látek [33].



#### Der. 2-nitro-1-(4-tolylsulfonyl)-2-(3-methylfenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethanů

### 2.1.3 Antifungální účinky

Houby jsou mikroorganismy neschopné fotosyntézy. Rostou díky tvorbě rozvětvených a propletených vláken, která se nazývají filamenta. Spousta těchto organismů způsobuje onemocnění nejen rostlin, ale i lidí a zvířat. Např. čeleď *Fusarium* nejenže snižuje kvalitu potravy, ale i přímo ohrožuje zdraví lidí a zvířat a to prostřednictvím mykotoxinů. Dickinson prováděl výzkum antifungálních látek a farmaceuticky aktivních solí různě substituovaného **triazolu**. Jedním ze substituentů na postranním řetězci byl i 1,2,4-oxadiazolový kruh připojený polohou 3 nebo polohou 5 [34].



**R<sup>1</sup>** = alkyl C<sub>1</sub> až C<sub>4</sub>

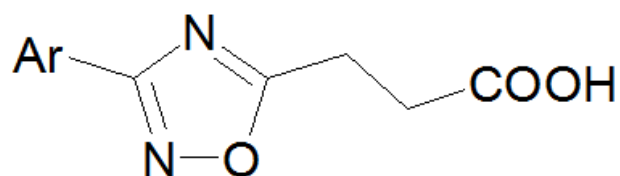
**R<sup>2</sup>** = H nebo alkyl C<sub>1</sub> až C<sub>4</sub>

**Het** = 1,2,4-oxadiazol-3 nebo 5-yl

#### Deriváty triazolu se substituovaným 1,2,4-oxadiazolem

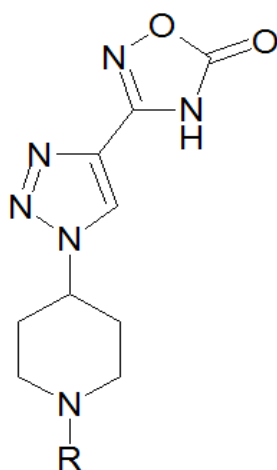
Narayanan a kolektiv syntetizovali řadu derivátů [(1,2,4-oxadiazol-3-yl)fenyl] esteru kyseliny karbamové nebo thiokarbamové následně testovaných jako potenciální antifungální, antibakteriální a protihlísticová činidla. Jejich patentovaný výzkum zahrnoval způsoby syntézy různě substituovaných (aminofenyl)-1,2,4-oxadiazolů. Dále zkoumali farmaceuticky vhodné soli těchto látek, jako např. hydrochlorid, hydrobromid, sulfát, fosfát, acetát, citrát aj. [35].

Filho a kolektiv syntetizovali nové deriváty **3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propionové kyseliny** a následně je testovali na potenciální antifungální aktivitu na pěti rozdílných druzích hub – *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. decemcellulare* a *F. lateritium*. Všechny nově syntetizované sloučeniny inhibovaly vždy minimálně jeden druh z testovaných druhů hub. Také vykazovaly larvicidní aktivitu [36].



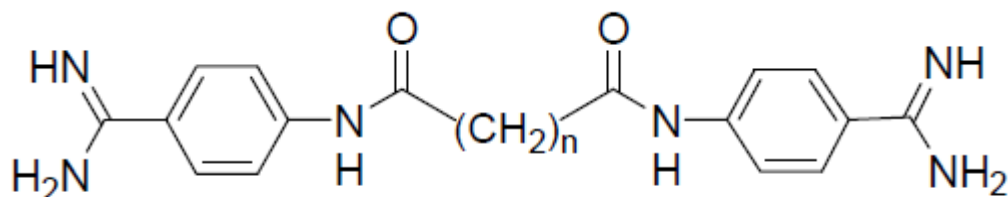
**3-(3-aryl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)propionová kyselina**

Sangshetti a kolektiv syntetizovali řadu nových derivátů **3-(1-(1-subst.piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on** jako potencionálních antifungálních sloučenin. Všechny sloučeniny byly *in vitro* testovány srovnáním jejich minimální inhibiční koncentrace s mikonazolem a flukonazolem. Některé sloučeniny vykazovaly vyšší účinnost proti *Candida albicans* a *Aspergillus flavus* než referenční mikonazol [37].

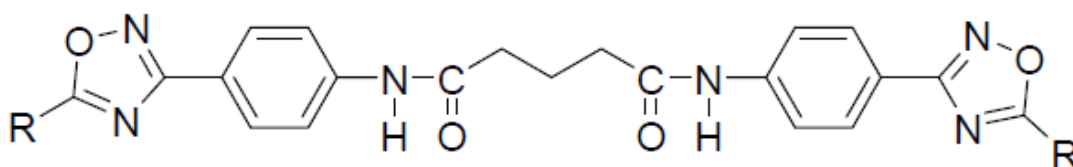


**3-(1-(1-subst.piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-on**

Kode a kolektiv navrhli řadu derivátů vycházejících ze struktury velmi nadějně antimykotické látky  $N^1, N^5$ -bis[4-( $N'$ -(karbamimidoyl)fenyl]glutaramidu (**TH-701**). **Deriváty** této látky s oxadiazolovým kruhem byly syntetizovány jako skryté bis-amidin proléčiva. Předpokládá se aktivace těchto látek *in vivo* pomocí příslušných jaterních enzymů. Nejenže se přidáním oxadiazolového kruhu sníží bazicita, také se zvýší lipofilita celé látky a dojde k navýšení biologické dostupnosti po perorálním podání [38].

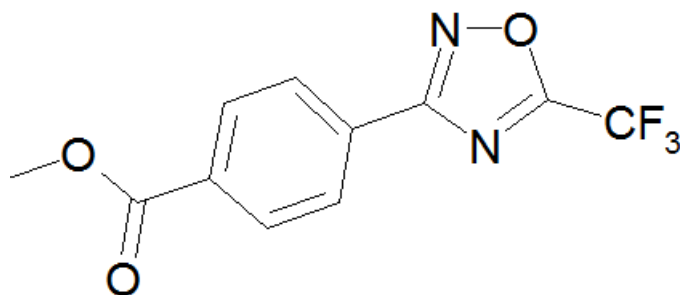


TH-701 :  $n = 3$



$N^1, N^5$ -bis[4-(5-alkyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)fenyl]glutaramid

Tale a kolektiv syntetizovali řadu derivátů s 1,2,4-oxadiazolem. Sloučeniny byly následně testovány *in vitro* pro jejich potenciální antifungální účinky. Jeden **derivát** vykazoval aktivitu dokonce 5x vyšší než referenční léčivo mikonazol proti *Fusarium solani*. Autoři se domnívali, že antifungální aktivita může být zvýšena přítomností CF3 skupiny na oxadiazolovém kruhu [25].



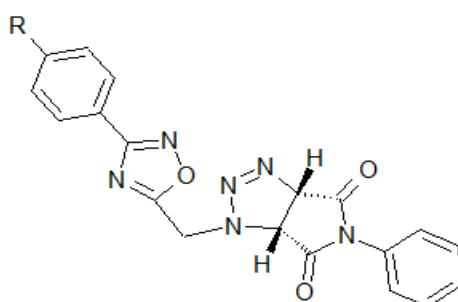
Derivát s nejvyšší antifungální aktivitou [25]

## 2.2. Další biologické účinky

### 2.2.1 Antiprotozoální účinky

Malárie je nejvýznamnější parazitární chorobou způsobenou zimničkami. Nejznámější je zimnička tropická, neboli *Plasmodium falciparum*, která je nejčastějším původcem tohoto vážného onemocnění. Malárie je na člověka přenesena bodnutím komára rodu *Anopheles*. Každoročně světová zdravotnická organizace (WHO) zaznamená na 300 milionů nových případů [39]. Mezi další závažná parazitická onemocnění přenášená vektory řadíme např. spavou nemoc. Akutní forma nemoci ve východní Africe je způsobena prvokem *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Na člověka je přenášena prostřednictvím mouchy tse-tse. Toto onemocnění má fatální následky, které se dostavují v průběhu týdnů až měsíců [40]. Chagasova nemoc je způsobena bičíkovcem *Trypanosoma cruzi* a je přenášena na člověka především pomocí krvesajících ploštic. Vyskytuje se hlavně ve venkovských oblastech v Jižní Americe, ale vzhledem k velké migraci obyvatelstva byly hlášené i případy tohoto onemocnění v USA. Podle Světové zdravotnické organizace na světě žije přes dvanáct milionů infikovaných osob. Ročně zemře přes patnáct tisíc lidí [41]. Leishmanióza je způsobena bičíkovci rodu *Leishmania*. Nákazu přenášejí flebotomové – drobný hmyz podobný komárům. Existují tři odlišné formy: viscerální, kožní a mukokutánní. Endemické oblasti tohoto onemocnění se nacházejí celkem v 88 zemích oblasti tropů a subtropů [42]. Bohužel zatím neexistuje dlouho trvající očkování proti těmto chorobám a přenašeči začínají být rezistentní na používané insekticidy. Běžně dostupná antiparazitika nejsou považována za ideální léčiva, jak z hlediska efektivity, ceny, rezistence, stability, aj. Z toho důvodu je velmi důležitý výzkum možných alternativ, jak přírodních, tak syntetických.

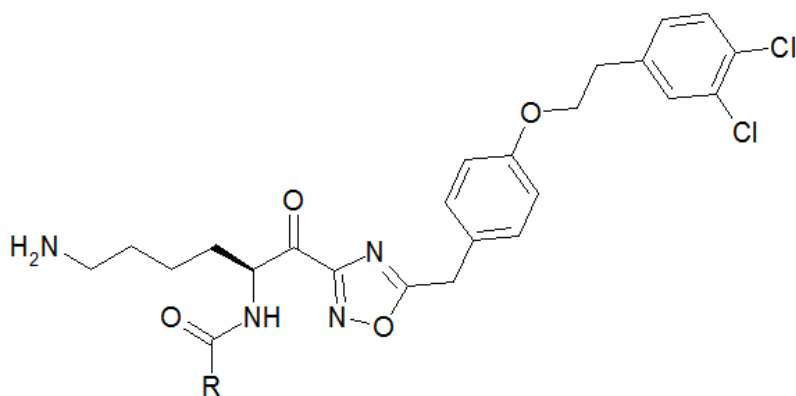
Antiprotozoální účinky byly nalezeny i u derivátů s oxadiazolovým heterocyklem. Oxadiazoly se chovají jako bioisostery amidů a jsou velmi stabilní, proto se jejich struktura nabízí jako vhodný skelet pro syntézu nových druhů antiprotozoálních drog. Pro příklad jsou uvedeny různé variace 3-(4-substituovaný-aryl)-1,2,4-oxadiazolu, jehož účinek byl proti *T. cruzi* srovnatelný s benznidazolem [43,44]. Ve snaze o nalezení nových látek bylo syntetizováno jedenáct nových **disubstituovaných derivátů 1,2,4-oxadiazolu**. Všechny tyto látky byly testovány pro jejich potenciální antiprotozoální a cytotoxický účinek. Syntetizované sloučeniny ukázaly vyšší citlivost k *L. donovani*, ale jejich *in vitro* aktivita proti ostatním prvokům byla malá [45].



Disubst. deriváty 1,2,4-oxadiazolu

### 2.2.2 Anti-astmatické účinky

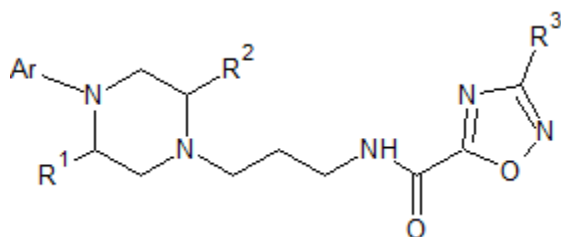
V rámci výzkumu byly syntetizovány  **$\alpha$ -keto-1,2,4-oxadiazoly**. Tyto látky se chovají jako inhibitory tryptasy žírných buněk. Tryptasa je schopna způsobit bronchiální hyperreaktivitu a infiltraci eozinofilů, neutrofilů, aj. v dýchacích cestách. Tento enzym je zodpovědný za střední a dlouhodobé projevy astmatu a vyskytuje se ve zvýšené míře i u alergiků. Přítomnost 3,4-dichlorofenethylové skupiny zvyšuje farmakokinetické parametry, jako např. clearance a biologický poločas [46,47].



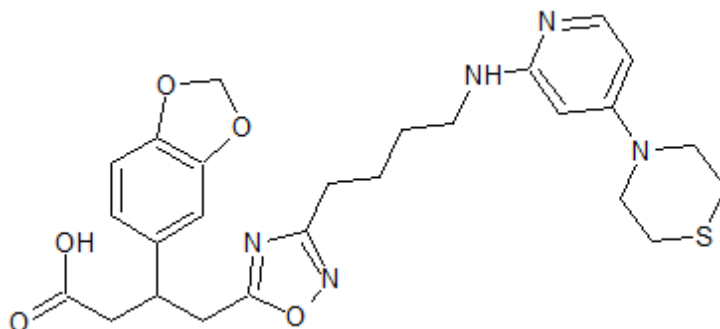
**Příklad 1,2,4-oxadiazolového anti-astmatika**

### 2.2.3 Protirakovinné účinky

Pojem rakovina zahrnuje více než jeden tisíc různých onemocnění. Všechna jsou charakterizována nekontrolovatelným dělením abnormálních buněk. Přišlo se na to, že 1,2,4-oxadiazoly mohou zasahovat do apoptózy buněk. Z toho důvodu byla syntetizována série **1,2,4-oxadiazol-5-karboxamidů**. Byly testovány jako inhibitory enzymu glykogen-synthasa-kinasy 3, který je klíčem regulace buněčné diferenciaci a proliferace [48]. Alternativní protirakovinná strategie zahrnuje inhibici procesů, které jsou zahrnuty v buněčném růstu, např. angiogeneze. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  je receptor, který byl nalezen na povrchu mnoha nádorových buněk. Antagonisté tohoto receptoru jsou schopni inhibovat právě angiogenezi, což je proces novotvorby krevních kapilár. Byly testovány různé deriváty **1,2,4-oxadiazolymáselné kyseliny** jako nepeptidické analogy antagonistů  $\alpha_v\beta_3$  [49].

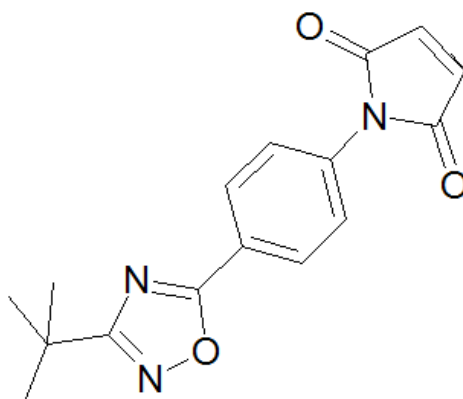


**1,2,4-oxadiazol-5-  
karboxamid**



**1,2,4-oxadiazolylmásečná  
kyselina**

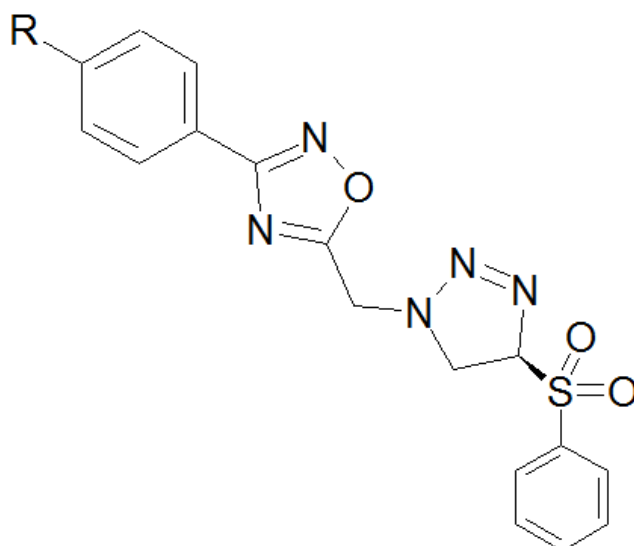
Maftain a kolektiv syntetizovali řadu nových derivátů oxadiazolů inspirovanou přírodními látkami nesoucími *N*-fenylmaleinimid nebo *N*-fenylsukcinimid. Všechny tyto látky byly následně testovány proti jedenácti buněčným řadám měřením cytotoxicity a proliferace. Nejaktivnější byl **derivát** nesoucí maleinimidovou skupinu. Pravděpodobně kvůli tomu, že se maleinimid rychle váže na pozici 34 (cystein) cirkulujícího albuminu, transportován jako albuminový konjugát a poté je uvolněn v příslušné tkáni. Bohužel tyto látky měly i vedlejší toxické účinky [50].



**Derivát s maleinimidovou skupinou**



Dürüst a kolektiv syntetizovali jedenáct derivátů substituovaných fenylsulfonylem nesoucích 1,2,4-oxadiazol, který je v poloze 3 substituován para-substituovaným fenylem. Testovali jejich účinek proti lidským buňkám karcinomu prsu, konkrétně linii MCF-7. Bohužel jejich  $IC_{50}$  byly vysoké, tudíž se sloučeniny ukázaly méně aktivními [51].

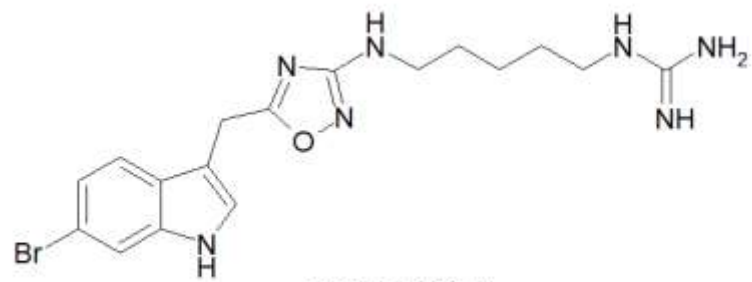


**R** = H; Cl; Br;  
Me; F; I; MeO;  
MeS; CF<sub>3</sub>; NO<sub>2</sub>  
nebo Me<sub>2</sub>N

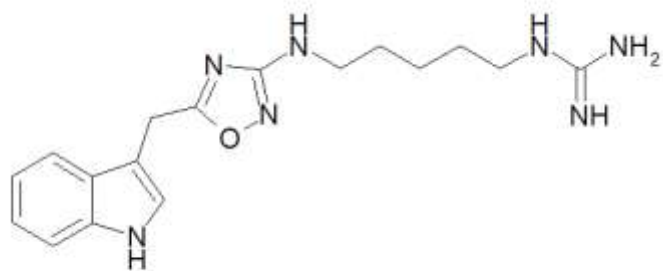
#### **Příklady derivátů syntetizované Dürüstem a kolektivem [51]**

### **2.2.4 Přírodní látky s oxadiazolem**

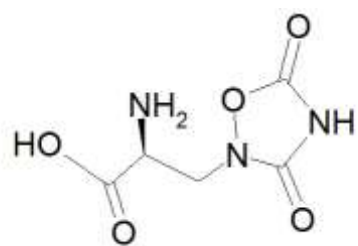
Je známo několik přírodních látek nesoucích 1,2,4-oxadiazolový kruh. Jedná se o substituované indolové alkaloidy substituované v poloze 3, a to konkrétně phidianidine A a phidianidine B. Tyto látky jsou selektivními inhibitory dopaminového transportéru DAT a parciálními agonisty  $\mu$  opioidního receptoru [52]. Dalším příkladem je kyselina chischalová, která je silným agonistou dvou receptorů excitačních aminokyselin a skupiny I metabotropního glutamátového receptoru. Tento metabolit byl získán ze semen a plodů rostliny *Quisqualis chinensis* [53,54].



phidianidine A



phidianidine B

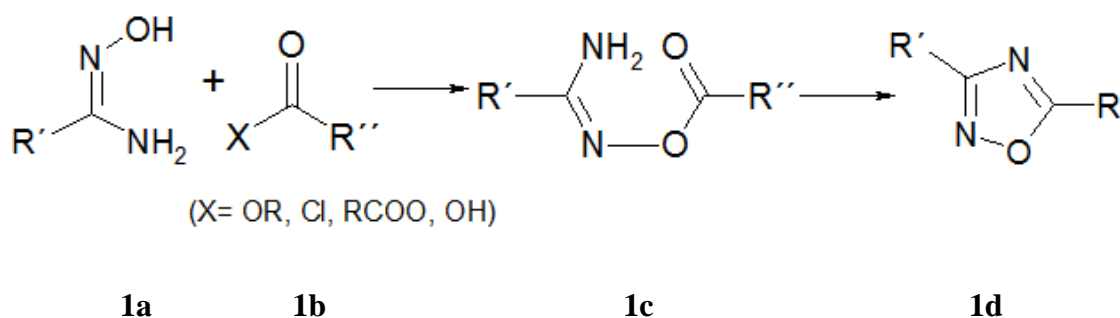


Kyselina chischalová

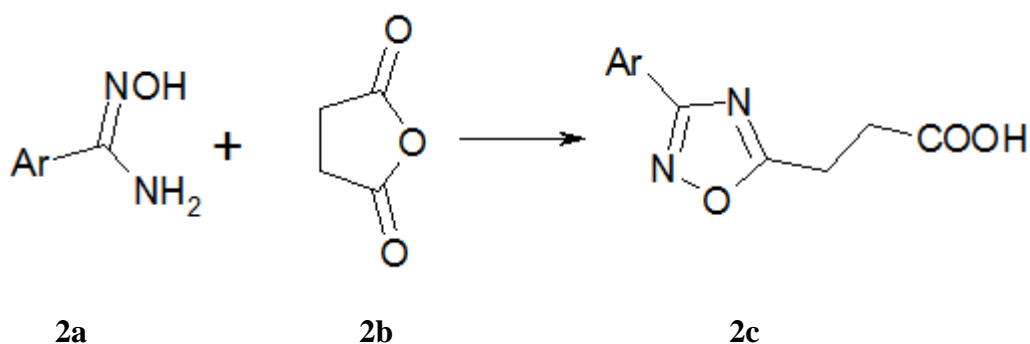
### 3. Metodická část

Pro přípravu 1,2,4-oxadiazolového kruhu existuje několik syntetických cest. Podmínkám amidoximové cesty se podrobně věnovala Katirtzi [3] ve své diplomové práci, existují ale i jiné způsoby, proto zde uvedu několik příkladů [45, 55].

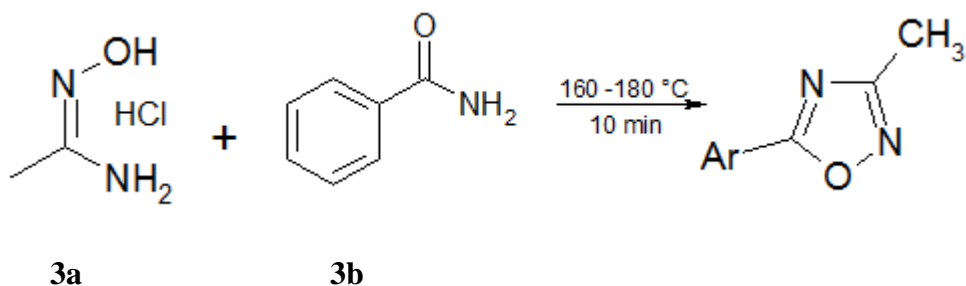
Jednou z možných cest přípravy tohoto heterocyklu je s použitím amidoximů jako intermediátů. Tímto způsobem byly syntetizovány i naše deriváty. Tyto sloučeniny byly poprvé pojmenovány Tiemannem v roce 1884. Oxadiazoly (**1d**) mohou být syntetizovány reakcí amidoximu (**1a**) s vhodně aktivovanými deriváty karboxylových kyselin (**1b**) jako estery, anhydridy, acylhalogenidy. Syntéza probíhá přes meziprodukt (**1c**) [55]. O amidoximech více pojednává diplomová práce Horké [1].



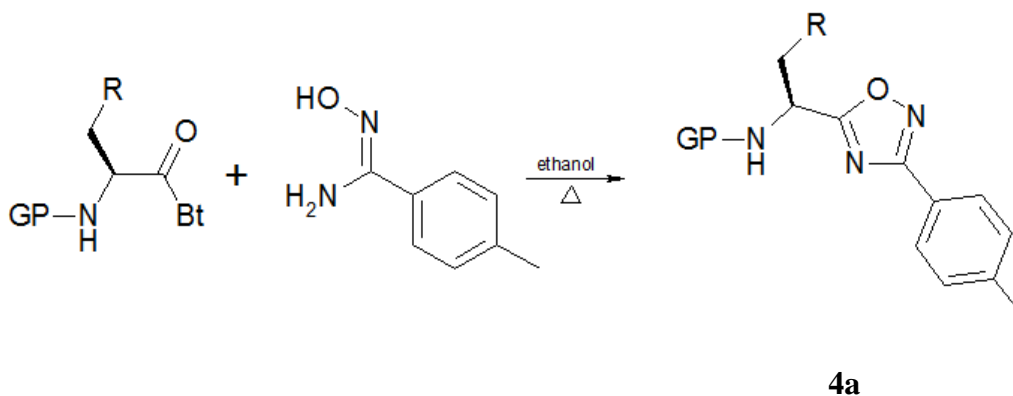
Reakcí derivátů benzamidoximu (**2a**) s anhydridem kyseliny jantarové (**2b**) vzniká odpovídající  $\beta$ -(3-aryl-[1,2,4]-oxadiazol-5-yl)propionová kyselina (**2c**) [56].



Dalším možným způsobem přípravy 1,2,4-oxadiazolu je zahřívání amidu (**3b**) při zvýšené teplotě se solí amidoximu (**3a**). Tento způsob přípravy nabízí vysoké výtěžky kolem 81-95% [57].



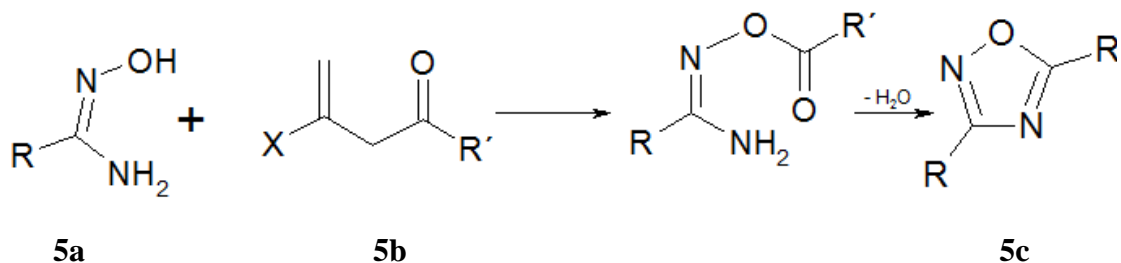
Katritzky a kolektiv syntetizovali deriváty 1,2,4-oxadiazolu (**4a**) z ( $\alpha$ -aminoacyl)benzotriazolů. Výtěžky těchto reakcí se pohybovaly v rozmezí 70–94%. Tyto deriváty byly shledány nejméně z 97% enantiomerně čistými látkami a to pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a NMR spektroskopie [58].



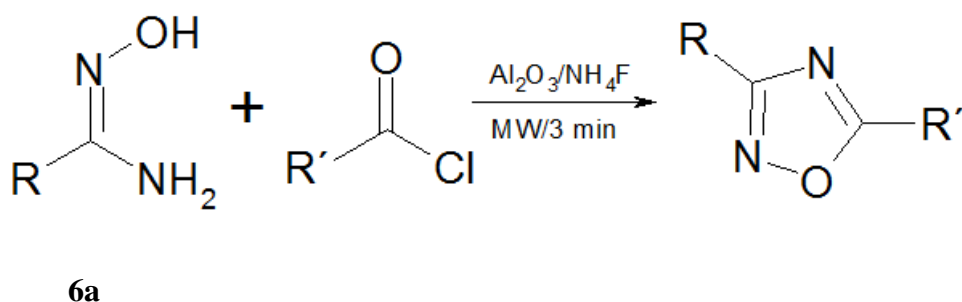
**Bt** = benzotriazol-1-yl

Amino kyseliny - **R** = alanin, valin, feny alanin, methionin, tryptofan a glutamin

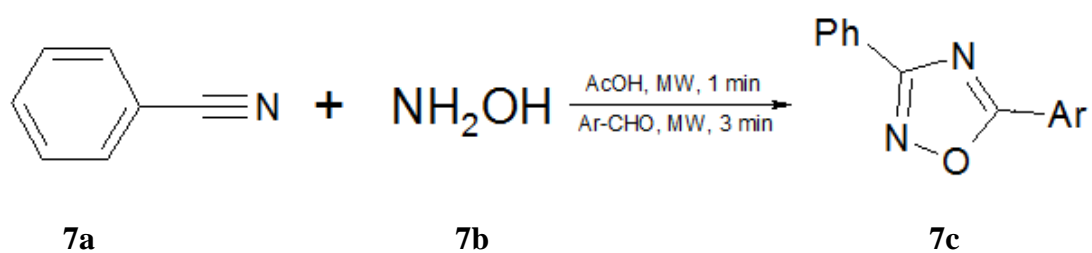
Syntéza 1,2,4-oxadiazolů (**5c**) z esterů enolů (**5b**), konkrétně vinylu nebo isoprenyly, s amidoximem (**5a**) byla popsána *Durdenem* a spol. [59].



V posledních letech došlo k nárůstu syntetických prací za asistence mikrovln. Většinou tato metoda přináší čistější produkty s velkým výtěžkem. Jako příklad lze uvést vědeckou práci Kaboudina a kolektivu. Ti popsali syntézu s pomocí oxidu hlinitého a fluoridu amonného. S použitím mikrovlnného záření, substituovaných amidoximů (**6a**) a pomocných sloučenin dosáhli cyklizace s velkým procentuálním výtěžkem. Fluorid amonný se zde chová jako silná báze a podporuje utvoření heterocyklického kruhu. Reakce amidoximů s acylchloridy v přítomnosti hliníku bez použití fluoridu amonného vede pouze k syntéze odpovídajících *O*-acylamidoximů jako hlavních produktů [60].



Adib se spolupracovníky popsali syntézu 3,5-disubstituovaných[1,2,4]-oxadiazolů (**7c**) bez použití rozpouštědel. Jedná se o dvojestupňovou syntézu typu one-potu, kdy reaguje nejprve nitril (**7a**) a hydroxylamin (**7b**) a následně je přidán aromatický aldehyd. Výtěžky se pohybovaly mezi 92 –97% [61].



## 4. Experimentální část

### 4.1 Chemická část

Při přípravě byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny:

- Pyrazin-2-karbonitril (99%, Aldrich)
- Kyselina pivalová (99%, Avocado)
- Kyselina máselná (99%, Fluka)
- Hydroxylamin-hydrochlorid, p. a. (Lachema)
- Anhydrid kyseliny octové, čistý (Penta)

Ostatní meziprodukty byly v laboratoři k dispozici od předchozích studentů [2,3,62].

TLC chromatografie byla prováděna na TLC hliníkových fóliích Silikagel 60 F254 (Merck Germany). Jako mobilní fáze byla používána směs hexan + ethyl-acetát 80:20 (v/v). Pro další TLC chromatografie uvedu mobilní fáze u příslušných derivátů.

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na digitálním bodotávku Stuart SMP20 a nebyly korigovány.

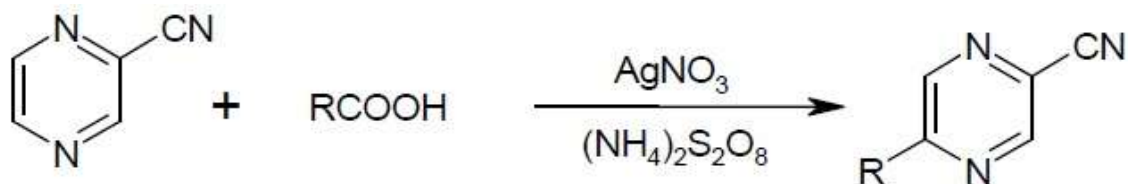
Elementární analýzy byly provedeny u látky 4.1.2.1 na analyzátoru EA 1110CHNS Analyzer (Carlo Erba), u ostatních na analyzátoru Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Germany).

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET 6700 metodou ATR-Ge. Vlnočty jsou uváděny v  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$ -NMR (299.95 MHz) a  $^{13}\text{C}$ -NMR (75.43 MHz) spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-VxBB 300 v DMSO- $d_6$ . Chemické posuny jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (2,49 pro  $^1\text{H}$ , 39,7 pro  $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny jsou uváděny v  $\delta$ , ppm a interakční konstanty  $J$  v Hz.

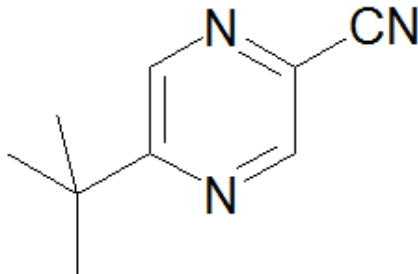
#### 4.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

*Obecný postup:*



10,50 g (0,1 mol) pyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 300 ml vody předem zahřáté na 80 °C. K tomuto roztoku bylo přidáno 1,70 g (0,01 mol) dusičnanu stříbrného a příslušné kyseliny (0,1 mol). Za míchání byl pozvolna přikapáván roztok 25,10 g peroxidisíranu amonného (0,08 mol) v 70 ml vody. Teplota během přikapávání byla udržována v rozmezí 75 – 80 °C. Celá směs se při stanovené teplotě hodinu míchala. Zchladlá směs byla poté zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného na pH 9 – 10 a kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtřepok byl vysušen bezvodým síranem sodným a poté byl podroben dělení na sloupci za použití mobilní soustavy hexan + ethylacetát v poměru 8:2. Objem jedné odebírané frakce byl 75 ml [5].

##### 4.1.1.1 5-*terc*-butylpyrazin-2-karbonitril



Při přípravě bylo použito 10,2 g kyseliny pivalové.

Při sloupcové chromatografii byl použit silikagel 60 FLUKA (0,063 – 0,02 mm), 350 g.

Sumární vzorec:  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3$

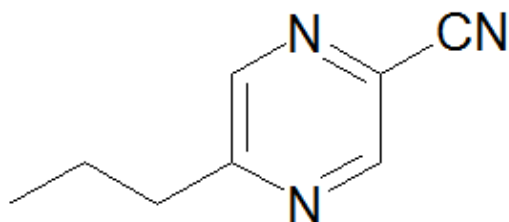
Molekulová hmotnost: 161,21

Vzhled: kapalná, mírně nažloutlá látka

Výtěžek reakce: 10,59 g (66 %)



#### 4.1.1.2 5-propylpyrazin-2-karbonitril



Při přípravě bylo použito 8,80 g kyseliny máselné.

Při sloupcové chromatografii byl použit silikagel 60 Fluka (0,063 – 0,2 mm), 350g.

Sumární vzorec: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

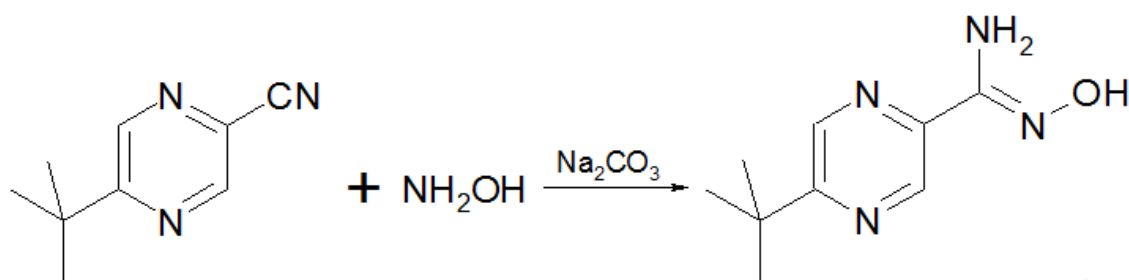
Molekulová hmotnost: 147,18

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek reakce: 1,44 g (10 %) čistého produktu

#### 4.1.2 Příprava N'-hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů

##### 4.1.2.1 5-*tert*-butyl-N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid



4,84 g (0,03 mol) 5-*tert*-butylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 4,5 ml ethanolu. Množství 4,17 g (0,06 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 4,5 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-*tert*-butylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 6,36 g (0,06 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 37,5 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Již po kápnutí prvních pár ml roztoku uhličitanu sodného se ve směsi objevil bílý precipitát. Celá směs byla zahřívána 5 hodin při teplotě 70°C pod

zpětným chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty, promyty vodou a překrytalizovány za varu z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O

Molekulová hmotnost: 194,24

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžek reakce: 3,25 g (56 %)

Teplota tání: 155,7 – 157,6 °C.

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočteno</b>	55,65	7,27	28,65
<b>Nalezeno</b>	55,52	7,73	29,20

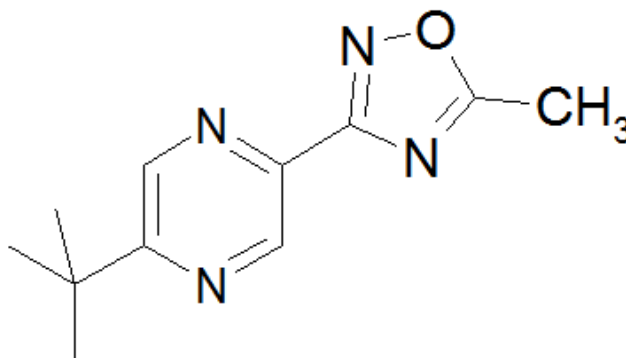
IČ spektrum: 3440, 3340 (-NH asoc.), 3166 (-OH asoc.), 2963 (alif.), 1674 (C=N), 939 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,13 (1H, s, OH), 8,97 (1H, s, H-3), 8,67 (1H, s, H-6), 5,89 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 1,34 (9H, s, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,4; 148,5; 143,2; 140,1; 139,4; 36,4; 29,7

#### 4.1.3 Příprava 3-(5-alkylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazolů

##### 4.1.3.1 3-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol



Směs 5-*tert*-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (1,94 g; 0,01 mol) a acetanhydridu (1,0 g; 0,01 mol) v 25 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 8:2, velikost frakce 25 ml. Produkt po chromatografii (1,6 g; 73 %). Byl rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O

Molekulová hmotnost: 218,26

Vzhled: bílé krystaly

Výtěžek reakce: 0,52g (24 %)

Teplota tání: 80,7 – 82,6 °C

Elementární analýza:

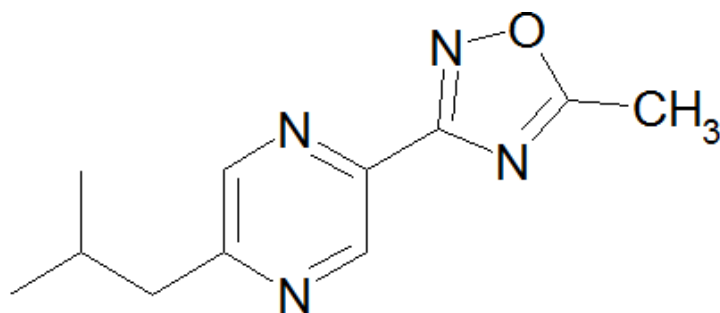
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno</b>	60,53	6,47	25,67
<b>Nalezeno</b>	60,49	6,44	25,18

IČ spektrum: 2969 (CH alif.), 1595 (C=N), 1168, 1160 (C-O), 933 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,13 (1H, d, *J*=1,5 Hz, Ar), 8,94 (1H, d, *J*=1,5 Hz, Ar), 2,71 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,38 (9H, s, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO) δ 178,2; 166,2; 166,1; 142,1; 142,9; 139,0; 36,9; 29,5; 12,2

#### 4.1.3.2 3-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol



Směs 5-isobutyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (1,94 g; 0,01 mol) a acetanhydridu (1,0 g; 0,01 mol) v 25 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 7:3, velikost frakce 25 ml. Výtěžek reakce byl po chromatografii 1,34 g (61 %). Byl rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

Po odsátí na Büchnerově nálevce a vysušení v exsiccátoru byl výtěžek reakce 0,7734 g.

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O

Molekulová hmotnost: 218,26

Vzhled: bílé krystaly

Výtěžek reakce: 0,77 g (35 %)

Teplota tání: 105,5-107,1 °C

Elementární analýza:

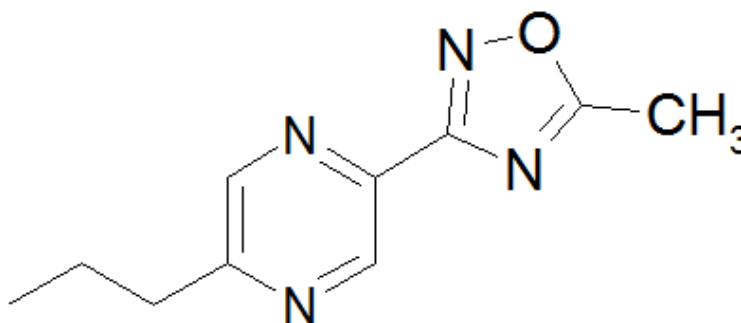
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno</b>	60,53	6,47	25,67
<b>Nalezeno</b>	60,92	6,73	26,13

IČ spektrum: 2960, 2934 (CH alifatický), 1591 (C=N), 1177 (C-O), 937 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9,12 (1H, d,  $J=1,0$  Hz, Ar), 8,70 (1H, d,  $J=1,0$  Hz, Ar)  
2,73 (2H, d,  $J=7,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,69 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2,16-2,05 (1H, m CH), 0,89 (6H, d,  
 $J=7,1$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  178,2; 166,3; 159,1; 145,2; 142,9; 139,3; 43,7; 28,5;  
22,3; 12,2

#### 4.1.3.3 5-methyl-3-(5-propylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol



Směs *N'*-hydroxy-5-propyl-pyrazin-2-karboximidamidu (1,8 g; 0,01 mol) a acetanhydridu (1,0 g; 0,01 mol) v 25 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 9:1, velikost frakce 25 ml. Výtěžek reakce byl po chromatografii 1,44 g (71 %). Byl rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec:  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$

Molekulová hmotnost: 204,23

Vzhled: bílé lesklé krystaly

Výtěžek reakce: 0,63 (31 %)

Teplota tání: 57,6 – 60,2 °C

Elementární analýza:

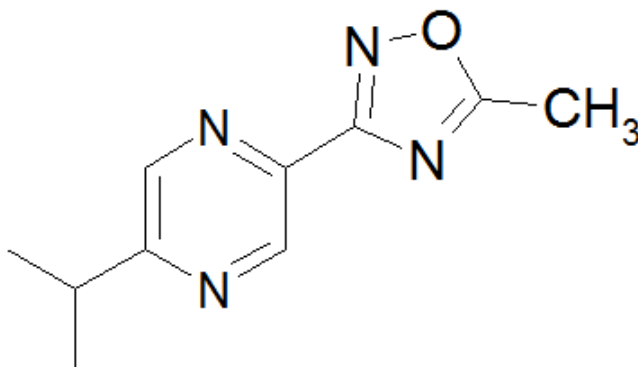
	% C	% H	% N
Vypočteno	58,81	5,92	27,43
Nalezeno	59,14	5,84	27,37

IČ spektrum: 3004 (CH arom.), 2962, 2928 (CH alif.), 1590 (C=N), 1181 (C-O), 923 (N-O)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9,11 (1H, d,  $J=1,4$  Hz, Ar), 8,73 (1H, d,  $J=1,4$  Hz, Ar) 2,84 (2H, t,  $J=7,5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,70 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1,79-1,68 (2H, m  $\text{CH}_2$ ), 0,92 (3H, t,  $J=7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ )

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  178,2; 166,3; 159,7; 144,8; 142,9; 139,3; 36,7; 21,9; 13,7; 12,2

#### 4.1.3.4 3-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol



Směs 5-isopropyl- $N'$ -hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (1,80 g; 0,01 mol) a acetanhydridu (1,0 g; 0,01 mol) v 25 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 9:1, velikost frakce 25 ml. Výtěžek reakce byl po chromatografii 1,93 g (95 %). Byl rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

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

Molekulová hmotnost: 204,23

Vzhled: bílé krystaly

Výtěžek reakce: 1,15 g (56 %)

Teplota tání: 63,3 – 64,9 °C

Elementární analýza:

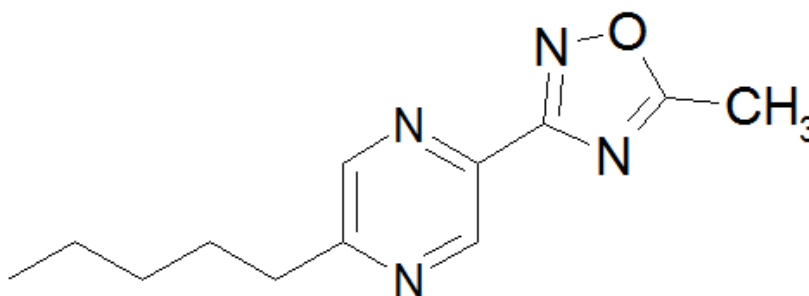
	% C	% H	% N
Vypočteno	58,81	5,92	27,43
Nalezeno	59,15	5,86	27,51

IČ spektrum: 2973, 2933 (CH alif.), 1593, 1579 (C=N), 1173, 1160 (C-O), 924 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,12 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar), 8,77 (1H, d, *J*=1,2 Hz, Ar) 3,27-3,14 (1H, m, CH), 2,70 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,29 (6H, d, *J*=6,8 Hz, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO) δ 178,2; 166,3; 164,2; 143,7; 142,8; 139,5; 33,5; 21,9; 12,2

#### 4.1.3.5 5-methyl-3-(5-pentylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol



Směs *N'*-hydroxy-5-pentyl-pyrazin-2-karboximidamidu (2,08 g; 0,01 mol) a acetanhydridu (1,0 g; 0,01 mol) v 25 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 9:1,

velikost frakce 25 ml. Výtěžek reakce byl po chromatografii 2,34 g (100 %).  
Byl dvakrát rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O

Molekulová hmotnost: 232,29

Vzhled: bílé lesklé krystaly

Výtěžek reakce: 0,86 g (37 %)

Teplota tání: 68,1 – 69,3 °C

Elementární analýza:

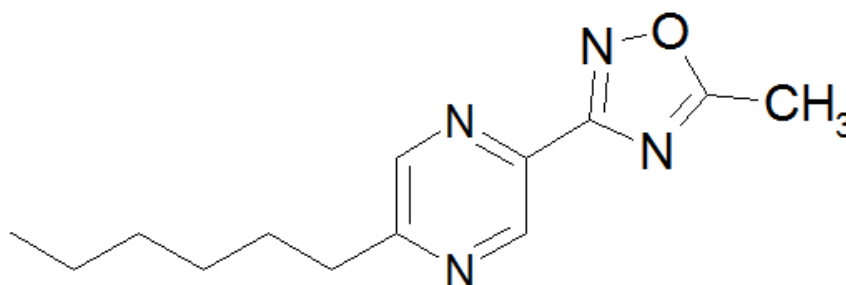
	% C	% H	% N
Vypočteno	62,05	6,94	24,12
Nalezeno	61,87	7,03	24,03

IČ spektrum: 2952, 2931 (CH alif.), 1591, 1579 (C=N), 1171 (C-O), 931 (N-O)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9,11 (1H, d, *J*=1,5 Hz, Ar), 8,73 (1H, d, *J*=1,5 Hz, Ar)  
2,85 (2H, t, *J*=7,2 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,69 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1,76-1,66 (2H, m CH<sub>2</sub>), 1,34-1,24 (4H,  
m, CH<sub>2</sub>), 0,85 (3H,t, *J*=7,2 Hz, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO) δ 178,2; 166,3; 160,0; 144,8; 142,9; 139,3; 34,7; 31,0;  
28,3; 22,0; 14,0; 12,2

#### 4.1.3.6 3-(5-hexylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol





Směs 5-hexyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (1,90 g;  $8,55 \times 10^{-3}$  mol) a acetanhydridu (0,87 g;  $8,55 \times 10^{-3}$  mol) v 21,38 ml xylenu byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Xylen byl odpařen za sníženého tlaku a zbytek byl poté umístěn do ledničky. Směs byla poté podrobena dělení na sloupci. Byl použit Silikagel 60 Merck (0,040-0,063 mm) a jako mobilní fáze byla použita směs toluen-aceton v poměru 9:1, velikost frakce 25 ml. Výtěžek reakce byl po chromatografii 1,72 g (82 %). Byl rekrystalizován z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{18}N_4O$

Molekulová hmotnost: 246,31

Vzhled: nažloutlé jehličkovité krystaly

Výtěžek reakce: 1,03 (49 %)

Teplota tání: 44,0 – 45,5 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočteno</b>	63,39	7,37	22,75
<b>Nalezeno</b>	63,48	7,4	22,655

IČ spektrum: 2958, 2933 (CH alif.), 1587, 1575 (C=N), 1163 (C-O), 914 (N-O)

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  9,10 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, Ar), 8,73 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, Ar) 2,85 (2H, t,  $J=7,4$  Hz,  $CH_2$ ), 2,69 (3H, s,  $CH_3$ ), 1,75-1,64 (2H, m  $CH_2$ ), 1,36-1,20 (6H, m,  $CH_2$ ), 0,83 (3H, t,  $J=7,4$  Hz,  $CH_3$ )

$^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO)  $\delta$  178,2; 166,3; 160,0; 144,7; 142,9; 139,2; 34,8; 31,2; 28,6; 28,4; 22,1; 14,0; 12,2

## 4.2 Biologická část

### Testované sloučeniny:

- 5-*terc*-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid = **AMOX-1**
- 3-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-1**
- 3-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-2**
- 5-methyl-3-(5-propylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-4**
- 3-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-10**
- 5-methyl-3-(5-pentylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-13**
- 3-(5-hexylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-14**

### 4.2.1 Hodnocení antifungální aktivity

Citlivost fungálních kmenů na připravené látky byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou [63,64]. Použité kmeny zahrnovaly *Candida albicans* ATCC 44859 (konkrétně ze sbírky American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, **CA**), *Candida tropicalis* 156 (**CT**), *Candida krusei* E28 (**CK**), *Candida glabrata* 20/I (**CG**), *Trichosporon asahii* 1188 (**TA**), *Aspergillus fumigatus* 231 (**AF**), *Absidia corymbifera* 272 (**AC**) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (**TM**). Výše zmíněné klinické izoláty pocházejí z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy nacházející se v Hradci Králové.

Všechny kmeny byly uchovávány na Sabouraudově dextrosovém agaru (SDA; Difco/Becton Dickinson, Detroit, USA) při teplotě 4°C. Jednotlivá inokula byla před každým testováním připravena suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospor ve sterilním 0,85% fyziologickém roztoku. Hustota buněk byla nastavena pomocí Bürkerovy komůrky. Byla upravena tak, aby zásobní suspenze obsahovala  $5 \times 10^3 \pm 0.2$  cfu.ml<sup>-1</sup> či  $5 \times 10^4 \pm 0.2$  cfu.ml<sup>-1</sup> buněk. Konečné inokulum bylo připraveno ředěním v poměru 1:20 zásobní suspenzí s testovacím médiem.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO, jejich antifungální aktivita byla následně stanovena v tkáňovém kultivačním médiu RPMI 1640 s glutaminem. PH tohoto média bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,165M 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonové kyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Kontroly obsahovaly pouze medium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřekročila 1% (v/v) celkového roztoku a nijak neovlivňovala růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), definované jako koncentrace vyvolávající min 80% inhibici růstu u kvasinek (IC<sub>80</sub>) nebo min 50% inhibici růstu u vláknitých hub (IC<sub>50</sub>) v porovnání s kontrolami. Hodnoty jednotlivých MIC byly vyhodnoceny po 24 a 48 hodinách statické kultivace při teplotě 35°C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly hodnoty MIC odečítány až po 72 a 120 h. Jako referenční látky byly užity flukonazol a amfotericin B.

**Tabulka 1:** Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN (kód)	Testovaná látka	MIC (μmol.l <sup>-1</sup> )					
		AMOX-1	OXDI-1	OXDI-2	OXDI-4	AMP-B	FLU
CA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,002	0,82
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,068	1,63
CT	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,068	1,63
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,068	> 417,19
CK	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,135	52,24
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,135	104,47
CG	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,034	13,06
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,135	52,24
TA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1,082	3,26
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	2,164	6,53
AF	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,271	> 417,19
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,135	> 417,19
AC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1,082	> 417,19
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	2,164	> 417,19
TM	72h	> 500	> 500	> 500	> 500	1,082	26,12
	120h	> 500	> 500	> 500	> 500	1,082	52,24

**Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek**

Kmen (kód)	Testovaná látka	MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )				
		OXDI-10	OXDI-13	OXDI-14	AMP-B	FLU
<b>CA</b>	24h	> 500	500	250	0,002	0,82
	48h	> 500	> 500	500	0,068	1,63
<b>CT</b>	24h	> 500	> 500	> 500	0,068	1,63
	48h	> 500	> 500	> 500	0,068	> 417,19
<b>CK</b>	24h	> 500	> 500	500	0,135	52,24
	48h	> 500	> 500	500	0,135	104,47
<b>CG</b>	24h	> 500	> 500	500	0,034	13,06
	48h	> 500	> 500	> 500	0,135	52,24
<b>TA</b>	24h	> 500	> 500	500	1,082	3,26
	48h	> 500	> 500	500	2,164	6,53
<b>AF</b>	24h	> 500	> 500	500	0,271	> 417,19
	48h	> 500	> 500	> 500	0,135	> 417,19
<b>AC</b>	24h	> 500	> 500	500	1,082	> 417,19
	48h	> 500	> 500	500	2,164	> 417,19
<b>TM</b>	72h	> 500	> 500	500	1,082	26,12
	120h	> 500	> 500	500	1,082	52,24

#### 4.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita všech testovaných látek byla vyhodnocena pomocí mikrodiluční bujónové metody [65]. Použité kmeny zahrnovaly kmeny z České sbírky mikroorganismů (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (**SA**), *Escherichia coli* CCM 4517 (**EC**), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (**PA**). Tyto kmeny jsou doporučeny jako standardní pro testování antibakteriálních účinků. Další kmeny jsou klinické izoláty (Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové): *Staphylococcus aureus* H 5996/08 (methicilin rezistentní- **MRSA**), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (**SE**), *Enterococcus sp.* J 14365/08 (ESBL pozitivní – **KP-E**). Všechny kmeny byly kultivovány na Müller-Hintonově agaru (MHA, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při teplotě 35°C a byly uchovávány na stejném médiu při teplotě 4°C. Před každým testováním byl každý kmen pasážován na MHA. Bakteriální inokula byla připravena suspendováním ve sterilním fyziologickém roztoku

0,85%. Hustota suspenze byla poté pomocí denzitometru nastavena na 0,5 stupně McFarlandovy stupnice, tj.  $1,5 \times 10^8$  cfu.ml<sup>-1</sup>.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a jejich antibakteriální aktivita byla následně stanovena v Müller-Hintonově bujónu (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při pH 7,0. Kontroly obsahovaly pouze medium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřekročila 1% (v/v) a tím pádem neovlivňovala přirozený růst bakterií. Minimální inhibiční koncentrace (MIC v  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), což jsou koncentrace vyvolávající 95% inhibici růstu ve srovnání s kontrolami, byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické kultivace při teplotě 35°C. Jako referenční látka byl použit ciprofloxacin.

**Tabulka 3:** Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN (kód)	Testované látky - MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )					
		AMOX-1	OXDI-1	OXDI-2	OXDI-4	CIPR
<b>SA</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,98
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,98
<b>MRSA</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	<b>500</b>
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	<b>500</b>
<b>SE</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	250
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	250
<b>EF</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,98
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,98
<b>EC</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,06
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,06
<b>KP</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,12
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,12
<b>KP-E</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
<b>PA</b>	72h	> 500	> 500	> 500	> 500	3,9
	120h	> 500	> 500	> 500	> 500	7,81

**Tabulka 4:** Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN (kód)	Testované látky - MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )				
		OXDI-10	OXDI-13	OXDI-14	CIPR
<b>SA</b>	24h	> 500	> 500	> 500	0,98
	48h	> 500	> 500	> 500	0,98
<b>MRSA</b>	24h	> 500	> 500	<b>500</b>	<b>500</b>
	48h	> 500	> 500	<b>500</b>	<b>500</b>
<b>SE</b>	24h	> 500	> 500	<b>500</b>	250
	48h	> 500	> 500	<b>500</b>	250
<b>EF</b>	24h	> 500	> 500	> 500	0,98
	48h	> 500	> 500	> 500	0,98
<b>EC</b>	24h	> 500	> 500	> 500	0,06
	48h	> 500	> 500	> 500	0,06
<b>KP</b>	24h	> 500	> 500	> 500	0,12
	48h	> 500	> 500	> 500	0,12
<b>KP-E</b>	24h	> 500	> 500	> 500	> 500
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500
<b>PA</b>	72h	> 500	> 500	> 500	3,9
	120h	> 500	> 500	> 500	7,81

### 4.2.3 Hodnocení antituberkulotické aktivity

Antimykobakteriální test byl proveden na rychle rostoucím *Mycobacterium smegmatis* CCM 4622 (ATCC 607) z České sbírky mikroorganismů (Brno, Česká republika). Pro stanovení aktivity byla použita mikrodiluční bujónová panelová metoda v 96-jamkové mikrotitrační destičce. Kultivačním médiem byl bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) s 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % bujónu Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie).

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a naředěny bujónem tak, aby koncentrace byla 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Srovnávacími standardy pro stanovení aktivity byly isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Výsledná koncentrace DMSO nepřekročila 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst *M. smegmatis*.

Destičky byly inkubovány v temnu při 37 °C. Po 48 h byl přidán 0,005% roztok sodné soli resazurinu. Potom byl připraven 10% vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Oba roztoky byly smíchány ve stejném objemovém poměru a zfiltrány přes membránový filtr. Mikrotitrační destičky byly inkubovány další 4 hodiny. Antimykobakteriální aktivita je vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnoty byly odečteny na základě změny zbarvení roztoku (modrá barva – aktivní sloučenina, růžová barva – neaktivní sloučenina). Hodnoty MIC standardů byly v rozmezí 7,81–15,625 µg/ml pro INH, 0,78–1,56 µg/ml pro RIF a 0,098–0,195 µg/ml pro CPX. Všechna stanovení byla provedena dvakrát.

**Tabulka 5: Minimální inhibiční koncentrace proti *Mycobacterium smegmatis***

KMEN (kód)	Testovaná látka	MIC (µg.ml <sup>-1</sup> )				
		AMOX-1	OXDI-1	OXDI-2	OXDI-4	OXDI-10
MS	48h	250	250	250	>500	250
		OXDI-13	OXDI-14	INH	RFM	CPX
MS	48h	125	125	7,81	0,38	0,098

## 5. Diskuze

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na syntézu oxadiazolů jako finálních produktů. Tato syntéza byla třístupňová, ale některé meziproducty již byly v laboratoři k dispozici [2,3]. Jako první byly syntetizovány alkylované pyrazin-2-karbonitrily podle Opletalové a spol. radikálovou alkylací pyrazinkarbonitrilu [3]. Po syntéze bylo nutno provést kolonovou chromatografií a to hlavně kvůli možnému vzniku nežádoucích polohových izomerů, které bylo potřeba oddělit od čisté látky. Výtěžky reakcí zhruba odpovídaly dříve provedeným syntézám těchto derivátů. U 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu byl výtěžek nižší, ale část produktu byla přítomna ve směsných frakcích, které budou děleny na koloně při další syntéze tohoto nitrilu v budoucnu. Tento produkt využil pro syntézy jiný student.

Druhým krokem byla syntéza příslušných 5-alkyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidů. Postup a podmínky reakce byly převzaty od vědecké skupiny Gezginci a kolektivu [30]. Výtěžek byl 56 % a produkt stačilo přechistit rekrystalizací.

Posledním krokem byla cyklizace, která byla provedena podle patentovaného postupu Fanshawe a Safir [66]. Touto reakcí byly získány deriváty, které nebyly dosud nikde v literatuře popsány:

- 3-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-1**
- 3-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-2**
- 5-methyl-3-(5-propylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-4**
- 3-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-10**
- 5-methyl-3-(5-pentylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-13**
- 3-(5-hexylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-14**

Cyklizace probíhala v prostředí xylenu reakcí 5-alkyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu s acetanhydridem. Pokud reakce probíhá v toluenu, dochází pouze k esterifikaci hydroxylové skupiny, ale změnou reakčních podmínek může docházet k cyklizaci na oxadiazol [31]. Po syntéze bylo nutné přechistit produkty sloupcovou chromatografií. Struktury byly potvrzeny IČ, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektry a čistota potvrzena elementární analýzou. Výtěžky jednotlivých reakcí se pohybovaly v rozmezí od 61 % do



100%, přičemž nejmenší výtěžek byl u derivátu s alkylovaným isobutylem. Největší výtěžek přísluší derivátu číslo deset s alkylovaným hexylem (**OXDI-10**). Většinou se jednalo o bílé jehličkovité krystaly.

Všechny finální sloučeniny a jeden meziprodukt (5-*tert*-butyl-*N'*-hydroxy-pyrazin-2-karboximidamid) byly následně testovány na katedře Biologických a lékařských věd na potenciální biologické účinky, konkrétně jako možné antifungální a antibakteriální látky. Na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv byla provedeno testování inhibice *Mycobacterium smegmatis*. Většina derivátů se ukázala jako neúčinná. Malou účinnost na vybrané kmeny hub a bakterií prokázaly deriváty s nejdelším alkylem, ale v porovnání se standardy je to zanedbatelná aktivita.

## 6. Závěr

V mé diplomové práci jsem připravila šest nových derivátů 3-(5-alkylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazolu:

- 3-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-1**
- 3-(5-isobutylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-2**
- 5-methyl-3-(5-propylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-4**
- 3-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-10**
- 5-methyl-3-(5-pentylpyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-13**
- 3-(5-hexylpyrazin-2-yl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazol = **OXDI-14**

Nejprve jsem homolytickou alkylací syntetizovala deriváty pyrazin-2-karbonitrilu, konkrétně 5-*terc*-butylpyrazin-2-karbonitril a 5-propylpyrazin-2-karbonitril. Následovala syntéza jednoho amidoximu, který byl stejně jako další různě substituované amidoximy poté zacyklen do příslušných substituovaných 1,2,4-oxadiazolů.

Všechny finální látky včetně jednoho meziprojektu byly testovány jako potenciální antifungální a antibakteriální sloučeniny. Většina se ukázala jako neaktivní nebo málo aktivní.

## 7. Literatura

1. Opletalová, V.; Deriváty acetylpyrazinů jako potenciální léčiva, Habilitační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006
2. Horká, M.; Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva I., Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2011, dostupná online  
[https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/81096/14131260/?q=%7B%22\\_searchform\\_search%22%3A%22hork%5Cu00e1%22%2C%22\\_searchform\\_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22\\_facetform\\_facets\\_workType%22%3A%5B%22DP%22%5D%2C%22\\_facetform\\_facets\\_faculty%22%3A%5B%221160%22%5D%2C%22PNzzpSearchListbasic%22%3A1%7D&lang=cs](https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/81096/14131260/?q=%7B%22_searchform_search%22%3A%22hork%5Cu00e1%22%2C%22_searchform_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22_facetform_facets_workType%22%3A%5B%22DP%22%5D%2C%22_facetform_facets_faculty%22%3A%5B%221160%22%5D%2C%22PNzzpSearchListbasic%22%3A1%7D&lang=cs)
3. Katirtzi, A.; Amidoximes as intermediates for the synthesis of potential drugs, Diplomová práce (online), Univerzita Kralova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, Česká republika, 2015, dostupná online  
[https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSIONFBFCABD58F669D5A586A423C1018C814/zzp/detail/140729/18047721/?q=%7B%22\\_searchform\\_search%22%3A%22katirzti%22%2C%22\\_searchform\\_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22PNzzpSearchListbasic%22%3A1%7D&back\\_id=7](https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSIONFBFCABD58F669D5A586A423C1018C814/zzp/detail/140729/18047721/?q=%7B%22_searchform_search%22%3A%22katirzti%22%2C%22_searchform_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22PNzzpSearchListbasic%22%3A1%7D&back_id=7)
4. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J. L.; Bach, F. L., Jr.; Safir, S. R.; Smith, V. K., Jr.; Williams, J. H.; Experimental therapy of tuberculosis II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 3617-3621
5. Opletalová, V.; Patel, A.; Boulton, M.; Dundrová, A.; Lacinová, E.; Převorová, M.; Appeltauerová, M.; Coufalová, M.; 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1996**, 61, 1093–1101
6. Kučerová-Chlupáčová, M.; Opletalová, V.; Jampílek, J.; Doletěl, J.; Dohnal, J.; Pour, M.; Kuneš, J.; Voříšek, V.; New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine ring derived from RP-HPLC study, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2008**, 73, 1–18

7. Kucerova-Chlupacova, M.; Kunes, J.; Buchta, V.; Vejsova, M.; Opletalova, V.; New Pyrazine Analogs of Chalcones: Synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity, *Molecules*, **2015**, 20, 1104–1117
8. Opletalová, V.; Hartl, J.; Patel, A.; Palát, K., Jr.; Buchta, V.; Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents, *Farmaco*, **2002**, 57, 135–144
9. Opletalová, V.; Pour, M.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Silva, L.; Kráľová, K.; Meltrová, D.; Peterka, M.; Posledníková, M.; Synthesis and biological evaluation of *E*-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2006**, 71, 44–58
10. Chlupáčová, M.; Opletalová, V.; Kuneš, J.; Silva, L.; Buchta, V.; Dušková, L.; Kráľová, K.; Synthesis and biological evaluation of some ring-substitued (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones, *Folia Pharm. Univ. Carol.*, **2005**, 33, 31–43
11. Opletalová, V.; Kalinowski, D. S.; Vejsová, M.; Kuneš, J.; Pour, M.; Jampílek, J.; Buchta, V.; Richardson, D. R.; Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: Cellular ion chelation mediating cytotoxic activity, *Chem. Res. Toxicol*, **2008**, 21, 1878–1889
12. On-line database available at (7. 12. 2015)  
<http://www.drugs.com/international/prenoxdiazine.html>
13. Kumar, R. R.; Perumal, S., Menéndez, Y.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Antimycobacterial activity of novel 1,2,4-oxadiazole-pyranopyridine/chromene hybrids generated by chemoselective 1,3-dipolar cycloadditions of nitrile oxides, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 3444–3450
14. Hutchinson, D. K.; Oxazolidinone antibacterial agents: a critical review, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, 1021–1042
15. Gravestock, M. B.; Recent developments in the discovery of novel oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 529–542
16. Lundstrom, T. S.; Sobel, J. D.; Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin, *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, **2004**, 18, 651-668

17. Ippolito, J. A.; Kanyo, Z. F.; Wang, D.; Franceschi, F. J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A.; Duffy, E. M.; Crystal structure of oxazolidinone antibiotic linezolid bound to the 50s ribosomal subunit, *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 3353–3356
18. Piccionello, A. P.; Musumeci, R.; Cocuzza, C.; Fortuna, C. C.; Guarcello, A.; Pierro, P.; Pace, A.; Synthesis and preliminary antibacterial evaluation of linezolid-like 1,2,4-oxadiazole derivatives, *Europ. J. Med. Chem.*, 50, **2012**, 441–448
19. Fortuna, C. G.; Berardozzi, R.; Bonaccorso, C.; Caltabiano, G.; Di Bari, L.; Goracci, L.; Guarcello, A.; Pace, A.; Piccionello, A. P.; Pesitelli, G.; Pierro, P. Lonati, E. Bulbarelli, A.; Cocuzza, C. E. A.; Musamarra, G.; Musumeci, R.; New potent antibacterials against Gram-positive multiresistant pathogens: Effects of side chain modification and chirality in linezolid-like 1,2,4-oxadiazoles, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 6814–6825
20. Jadhav, G. R.; Shaikh, M. U.; Kale, R. P.; Ghawalkar, A. R.; Gill, Ch. H.; Synthesis, characterization and antimicrobial activities of clubbed [1,2,4]-Oxadiazoles with Fluorobenzimidazoles, *J. Het. Chem.*, **2009**, 46, 980–987
21. Wheeler, W. J.; Deeter, J. B.; Finley, D. R.; Kinnick, M. D.; Koehler, R.; Osborne, H. E.; Ott, J. T.; Swartzendruber, J. K.; Wishka, D. G.; Synthesis and biological evaluation of  $7\beta$ -[2-(5-amino-1,2,4-oxadiazol-3-yl)-2-Z-methoximinoacetamido]-cefalosporin derivatives, *J. Antibiot.*, **1985**, 39, 111–120
22. O'Daniel, P. I.; Peng, Z.; Pi, H.; Testero, S. A.; Ding, D.; Spink, E.; Leemans, E.; Boudreau, M. A.; Yamaguchi, T.; Shroeder, V. A.; Wolter, W. R.; Llarrull, L. I.; Song, W.; Lastochkin, E.; Kumarasiri, M.; Antunes, N. T.; Espahbodi, M.; Lichtenwalter, K.; Suckow, M. A.; Vakulenko, S.; Mobashery, S; Chang, M.; Discovery of a new class of non- $\beta$ -lactam inhibitors of penicillin-binding proteins with Gram-positive antibacterial activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 136, 3664–3672
23. On-line database available at (18. 12. 2015):  
<https://en.wikipedia.org/wiki/Carbapenem>
24. Oh, CH. H.; Dong, H. G.; Lee, J. S.; Lee, S. Ch.; Hong, J. H.; Cho, J. H.; Synthesis and antibacterial activity of  $1\beta$ -methyl-2-(5-substituted oxadiazolo pyrrolidin-3-yl-thio)carbapenem derivatives, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, **2003**, 336, 567–572

25. Tale, R. H.; Rodge, A. H.; Keche, A. P.; Hatnapure, G. D.; Padole, P. R.; Gaikwas, G. S.; Turkar, S. S.; Synthesis and anti-bacterial, anti-fungal activity of novel 1,2,4-oxadiazole, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2011**, 3(2), 496-505
26. Huguet, F.; Melet, A.; Alves de Sousa, R.; Lieutauds, A.; Chevalier, J.; Maigre, L.; Deschamps, P.; Tomas, A.; Leulliot, N.; Pages, J. M.; Artaud, I.; Hydroxamic acids as potent inhibitors of Fe<sup>II</sup> and Mn<sup>II</sup> *E.Coli* methionine aminopeptidase: Biological activities and X-ray structures of oxazole hydroxamate-EcMetAP-Mn complexes, *ChemMedChem*, **2012**, 7, 1020–1030
27. Angehrn, P.; Buchmann, S.; Funk, Ch.; Goetschi, E.; Gmuender, H.; Hebeisen, P.; Kostrewa, D.; Link, H.; Luebbers, T.; Masciadri, R.; Nielsen, J.; Reindl, P.; Ricklin, F.; Schmitt-Hoffmann, A.; Theil, F. P.; New antibacterial agents derived from the DNA gyrase inhibitor Cyclothialidine, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 1487–1513
28. Rai, N. P.; Narayanaswamy, V. K.; Govender, T.; Manuprasad, B. K.; Shashikanth, S.; Arunachalam, P. N.; Design, synthesis, characterization, and antibacterial activity of {5-chloro-2-[(3(substituedphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-methoxy]-phenyl}-(phenyl)-methanones, *Eur. J. Med.Chem.*, **2010**, 45, 2677 – 2682
29. Willand, N.; Desroses, M.; Toto, P.; Dirié, B.; Lens, Z.; Villeret, V.; Rucktooa, P.; Loch, C.; Baulard, A.; Deprez, B.; Exploring drug target flexibility using in situ click chemistry: Application to a Mycobacterial transcriptional regulator; *ACS Chem. Biol.*, **2010**, 5, 1007–1013
30. Gezginci, M. H.; Martin, A. R.; Franzblau, S. G.; Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 1560–1567
31. Pancechowska-Ksepko, D.; Foks, D.; Henryk, F.; Janowiec, M., Zwolska-Kwiek, Z.; Synthesis and antibacterial activity of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyrazine and pyridine derivates. *Acta Polon. Pharm.*, **1986**, 43, 211–215
32. Ernst, D. B.; Bendas, H.; Dávilla, Uriel. New substances of possible chemotherapeutical value. I, *J. Org. Chem.*, **1994**, 37, 2421–2436
33. Tyrkov, A. G.; Urlyapova, N. G.; Daudova, A. D.; Synthesis and antimicrobial activity of substituted 2-nitro-1-(4-tolylsulfonyl)-2-(3-methylphenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)ethanes, *Pharmaceutical chemistry journal*, **2006**, 40, 30–31



<http://www.tropicke-nemoci.cz/chagasova-choroba>

42. On-line database available at (30. 12. 2015):

[http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&termId=1592&tname=Leishmani%C3%B3zy](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=1592&tname=Leishmani%C3%B3zy)

43. Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Olea-Azar, C.; 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 1941–1950

44. Dos Santos Filho, J. M.; Leite, A. C.; De Oliveira, B. G.; Moreira, D. R.; Lima, M. S.; Soares, M. B.; Leite, L. F.; Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-*N*-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 6682–6691

45. Dürüst, Y.; Karakuş, H.; Kaiser, M.; Tasdemir, D.; Synthesis and anti-protozoal activity of novel dihydropyrrolo[3,4-*d*][1,2,3]triazoles; *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 48, 296–304

46. Pace, A.; Pierro, P.; The new era of 1,2,4-oxadiazoles; *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 7, 4337–4348

47. Rakesh, D.; Sun, R. B.; Lee Tangallapally, R. P. and Lee R. E.; Synthesis, optimization and structure-activity relationships of 3,5-disubstituted isoxazolines as new anti-tuberculosis agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 460-472

48. Fujii, S.; Ohta, K.; Goto, T.; Kagechika, H.; Endo, Y.; Acidic heterocycles as novel hydrophilic pharmacophore of androgen receptor ligands with a carborane core structure, *Bioorg. Med Chem.* **2009**, 17, 344-350

49. Boys, M. L.; Schretzman, L. A.; Chandrakumar, N. S.; Tollefson, M. B.; Mohler, S. B.; Downs, V. L.; Penning, T. D. Russell, M. A.; Wendt, J. A.; Chen, B. B.; Stenmark, H. G.; Wu, H.; Sprangler, D. P.; Clare, M.; Desai, B. N.; Khanna, I. K.; Nguyen, M. N.; Duffin, T.; Engleman, V. Q.; Finn, M. B.; Freeman, S. K.; Hanneke, M. L.; Keene, J. L.; Klover, J. A.; Nickols, M. A.; Steininger, C. N.; Norring, S. A.; Convergent, parallel synthesis of a series of beta-substituted 1,2,4-oxadiazole butanoic acids as potent and selective alpha(v)beta3 receptor antagonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 839–844



50. Maftai, C. V.; Fodor, E.; Jones, P. G.; Franz, M. H.; Kelter, G.; Fiebig, H.; Neda I.; Synthesis and characterization of novel bioactive 1,2,4-oxadiazole natural product analogs bearing N-phenylmaleimide and N-phenylsuccinimide moieties, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 2202–2215
51. Dürüst, Y.; Karakus, H.; Yavuz, M. Z.; Gepdiremen, A. A.; Synthesis of novel triazoles bearing 1,2,4-oxadiazole and phenylsulfonyl groups by 1,3-dipolar cycloaddition of some organic azides and their biological activities, *Turk. J. Chem.*, **2014**, 38, 739–755
52. Brogan, J. T.; Stoops, S. L.; Lindsley, C. W.; Total synthesis and biological evaluation of phidianidines A and B uncovers unique pharmacological profiles at CNS targets, *ACS Chem. Neurosci.*, **2012**, 3, 658–664
53. Takemoto, T.; Takagi, N.; Nakajima, T.; Koike, K.; Studies on the constituents of *Quisqualis Fructus*. I. On the amino acids, *Yakugaku Zasshi*, **1975**, 95, 176–179
54. Flippen, J. L.; Gilardi, R. D., Quisqualic acids, *Acta Crystallogr.*, Sect. B, **1976**, 32, 951–953
55. Bora, R. O.; Dar, B.; Pradhan, V.; Farooqui, M.; [1,2,4]-oxadiazoles: Synthesis and Biological Applications, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2014**, 14, 355–369
56. Korzhavina, O. B.; Ryabukhin, Y. I.; Garnovskii, A. D.; Shvael, I.; Synthesis of 4-oxo-1,3-benzothiazines and their salts, *Chem. Heter. Comp.*, **1985**, 21, 472–473
57. Lin, Y. I.; Lang, S. A.; Lovell, Jr. M. F.; Perkinson, N. A.; New synthesis of 1,2,4-triazoles and 1,2,4-oxadiazoles, *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 4160–4163
58. Katritzky, A. R.; Shestopalov, A. A.; A convenient synthesis of chiral 1,2,4-oxadiazoles from N-protected ( $\alpha$ -aminoacyl) benzotriazoles, *ARKIVOC VII*, **2005**, 36–55
59. Durden, J. A.; Heywood, Jr. D. L.; The acylation of Benzamidoximes, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 4359
60. Kaboudin, B.; Saadati, F.; Novel method for synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using alumina supported ammonium fluoride under solvent-free condition, *J. Het. Chem.*, **2005**, 42, 699–706
61. Adib, M.; Jahromi, A. H.; Tavoosi, N.; Mahdavi, M.; Bijanzadeh, H. R.; Microwave-assisted efficient, one-pot, three-component synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions, *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 2965–2966
62. M. Hrušková, nepublikováno

63. Clinical Laboratory Standards Institute ( CLSI ). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard*, CLSI document M27-A3, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008
64. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard*, CLSI document M38-A2, 2nd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008
65. Jones, R. N.; Barry, A. L.; Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination, *J. Clin. Microbiol.*, **1987**, *25*, 1920-1925
66. Fanshawe, W. J.; Safir, S. R.; Cyclopropyl-1,2,4-oxadiazolyldiazines. US 3857843, Dec, 31, 1974

On-line database available at (18. 04. 2016):

[http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=3857843A&KC=A&FT=D&ND=3&date=19741231&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en\\_EP](http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=3857843A&KC=A&FT=D&ND=3&date=19741231&DB=worldwide.espacenet.com&locale=en_EP)