

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické
analýzy



Deriváty amidoximů jako syntetické intermediáty
a potenciální léčiva

Diplomová práce
Michaela Hariková

PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.
Hradec Králové 2018

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

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV 260 401.

Děkuji PharmDr. M. Kučerové, Ph.D. za její vstřícnost a ochotu, pomoc a cenné rady, které mi poskytla při tvorbě této práce.

*Dále děkuji paní doc. RNDr. V. Opletalové, Ph.D. za odborné rady, paní D. Štěpánové za provedení elementárních analýz, paní I. Vencovské za změření IČ spekter, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření a následnou interpretaci NMR spekter; RNDr. K. Konečné, Ph.D. a paní I. Dufkové za antibakteriální a antifungální testování a PharmDr. O. Jand'ourkovi, Ph.D. za změření antituberkulotické aktivity proti *M. smegmatis* a *M. aurum*.*

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 <i>N</i> -hydroxykarbimidoylchloridy	10
1.1.1 Antituberkulotická a antibakteriální aktivita	10
1.1.2 Antifungální aktivita	12
1.1.3 Cytoprotektivní účinky derivátů <i>N</i> -hydroxykarbimidoylchloridů	13
1.2 Chloridy jako intermediáty pro přípravu biologicky aktivních látek	16
1.2.1 Sloučeniny obsahující isoxazol	16
1.2.1.1 Isoxazolopyrazoly a isoxazolo[3,4- <i>d</i>]pyridaziny	16
1.2.1.2 Benzensulfonamidy obsahující isoxazol	19
1.2.2 Sloučeniny obsahující isoxazolin	21
1.2.2.1 Isoxazolin-kumarinové deriváty	21
1.3 Aminoderiváty	23
1.3.1 Antibakteriální a antituberkulotická aktivita	23
1.3.2 Protinádorové účinky	26
1.3.2.1 Oximy substituované aziridinem	26
1.3.2.2 Deriváty 6-methyluracil a 5-joduracil	28
1.3.2.3 Epakadostat	30
1.3.3 Antibakteriální účinky	33
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
1.4 Chemická část	35
1.4.1 Příprava 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu	36
1.4.2 Příprava <i>N'</i> -hydroxypyrazin-2-karboximidamidů	36

1.4.3	Příprava chloridů	39
1.4.4	Příprava aminoderivátů	45
1.5	Biologická část	48
1.5.1	Testování antimykobakteriální aktivity	48
1.5.2	Testování antibakteriální aktivity.....	50
1.5.3	Testování antifungální aktivity	52
DISKUZE	55
ZÁVĚR	57
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	58

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Název diplomové práce: Deriváty amidoximů jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva

Student: Michaela Hariková

Školitel: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

V teoretické části této diplomové práce jsou shrnuty biologické účinky *N*-hydroxykarbimidoylchloridů a aminoderivátů. Dále jsou popsány biologicky aktivní sloučeniny, které jsou syntetizovány z *N*-hydroxykarbimidoylchloridů, konkrétně sloučeniny obsahující isoxazol.

V experimentální části jsou uvedeny použité postupy pro syntézy derivátů amidoximů. Výchozí sloučeniny pro syntézu *N*-hydroxykarbimidoylchloridů byly příslušné alkylované amidoximy, které byly dostupné na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy nebo byly připraveny radikálovou alkylací pyrazinkarbonitrilu a následným převedením na amidoxim. Z *N*-hydroxykarbimidoylchloridu byl následně připraven aminoderivát.

Všechny připravené sloučeniny byly charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry. Čistota látek byla zkontrolována pomocí TLC a elementární analýzy.

Připravené deriváty byly podrobeny testování *in vitro* na jejich antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivitu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Title of diploma thesis: Amidoxime derivatives as synthetic intermediates and potential drugs

Student: Michaela Hariková

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

In the theoretical part of this diploma thesis, biological effects of *N*-hydroxykarbimidoylchlorides and amino derivatives are summarized. In addition, biologically active compounds which are synthesized from *N*-hydroxykarbimidoylchlorides, in particular the compounds containing isoxazole.

In the experimental part, the procedures used for the synthesis of amidoxime derivatives are described. Initial compounds for the synthesis of *N*-hydroxykarbimidoylchlorides were the corresponding alkylated amidoximes available at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis or prepared by radical alkylation of pyrazinecarbonitrile followed by conversion to amidoxime. From the *N*-hydroxykarbimidoylchloride, an amino derivative was subsequently prepared.

All prepared compounds were characterized by melting point, NMR and IR spectra. The purity of the substances was checked by TLC and elemental analysis.

The prepared derivatives were tested *in vitro* for their antibacterial, antimycobacterial and antifungal activity.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMF-B = amfotericin-B

CA = karboanhydrasa

COX = cyklooxygenasa

CPX = ciprofloxacín

DMSO = dimethylsulfoxid

FLU = flukonazol

GEN = gentamicin

IC₅₀ = koncentrace sloučeniny, která usmrtí 50 % buněk

IDO1 = indolamin-2,3-dioxygenasa 1

IDO2 = indolamin-2,3-dioxygenasa 2

IFN- γ = interferon γ

IL-6 = interleukin 6

INH = isoniazid

LD₅₀ = koncentrace sloučeniny, která inhibuje 50 % buněk

MFC = minimální fungicidní koncentrace

MIC = minimální inhibiční koncentrace

mTORC1 = savčí cíl rapamycinu komplex 1

NSAID = nesteroidní antiflogistika

PD-1 = programmed cell death protein 1

PD-L1 = programmed death-ligand 1

RIF = rifampicin

TDO = tryptofan-2,3-dioxygenasa

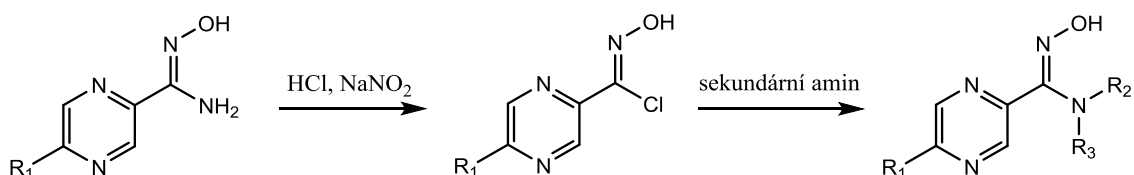
TLC = tenkovrstvá chromatografie

ÚVOD A CÍL PRÁCE

Tuberkulóza je infekční onemocnění nejčastěji způsobené bakterií *Mycobacterium tuberculosis*, které typicky postihuje plíce, může však postihnout i další orgány. V současné době je léčba zaměřena na kombinaci léčiv první linie, jsou to isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. Avšak neustále stoupající rezistence vede k nutnosti najít další účinná léčiva. [1]

Na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy byly syntetizovány a popsány výchozí sloučeniny pro moji práci – pyrazinkarboximidamid a jeho alkylované deriváty. Amidoximy mají široké spektrum biologických účinků (antibakteriální, fungicidní, antitrombotické, protizánětlivé a další) a používají se v syntézách jako meziproducty pro přípravu dalších biologicky aktivních sloučenin. [2–4]

Ve své diplomové práci se zaměřuji na deriváty amidoximů a jejich charakteristiku, konkrétně *N*-hydroxykarbimidoylchloridy, ze kterých jsem následně měla připravit aminoderiváty. Připravené sloučeniny byly testovány *in vitro* na jejich antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivitu.



R₁ = H, isobutyl, propyl aj.

R₂, R₃ = ethyl, morfolin

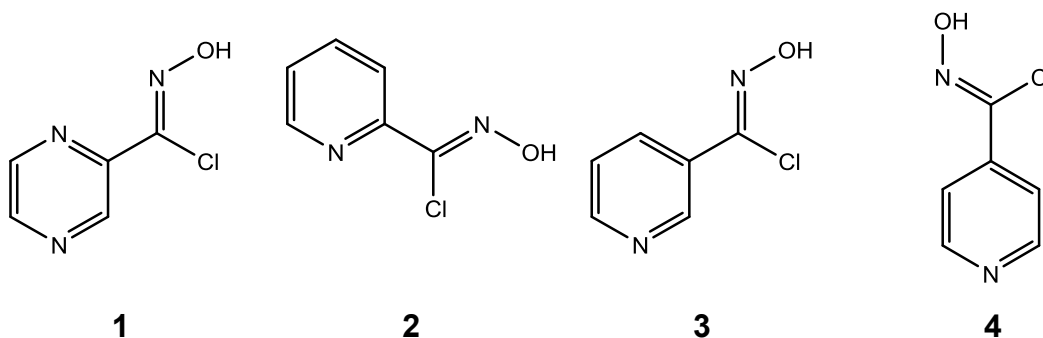
obecné schéma reakcí

TEORETICKÁ ČÁST

1.1 *N*-hydroxykarbimidoylchloridy

1.1.1 Antituberkulotická a antibakteriální aktivita

U *N*-hydroxykarbimidoylchloridů, které byly připraveny z příslušných amidoximů, byla testována jejich aktivita *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv a dalším dvěma kmenům, které byly izolovány od dvou pacientů trpících tuberkulózou. První z nich byl rezistentní na kyselinu *p*-aminosalicylovou, isoniazid, ethambutol a rifampicin, druhý byl citlivý na tato léčiva. Nejúčinnější sloučenina byla *N*-hydroxyisonikotinimidoylchlorid (**4**), její minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro kmen H₃₇Rv byla 12,5 μg/ml a pro ostatní kmeny 25 μg/ml a mohla by tedy být vůdčí strukturou pro další modifikace. U ostatních *N*-hydroxykarbimidoylchloridů byla jejich MIC v rozmezí 12–100 μg/ml. [2,3]



N-hydroxykarbimidoylchloridy vykazují také antibakteriální účinek proti anaerobním bakteriím. Jejich aktivita byla porovnávána s antibakteriální látkou metronidazolem (**M**). Aerobní bakterie byly inhibovány pouze sloučeninou **1**, která byla porovnána s amikacinem (**A**). Na některé z uvedených bakterií např. *Staphylococcus aureus* již vznikla rezistence na současně dostupná léčiva. Testované kmeny a sloučeniny s jejich MIC jsou uvedeny v tabulce 1 a 2. [2,3]

Tabulka 1

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	M	1	2	3	4
Anaerobní bakterie					
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	0,8	$\leq 6,2$	25	25	50
<i>Peptostreptococcus micros</i>	0,4	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$
<i>Actinomyces israelii</i>	1,6	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Actinomyces naeslundii</i>	6,2	100	≥ 200	≥ 200	12,5
<i>Propionibacterium acnes</i>	12,5	≥ 200	≥ 200	25	12,5
<i>Prevotella bivia</i>	$\leq 0,4$	50	100	25	$\leq 6,2$
<i>Prevotella buccalis</i>	$\leq 0,4$	100	≥ 200	≥ 200	$\leq 6,2$
<i>Prevotella intermedia</i>	$\leq 0,4$	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Prevotella loescheii</i>	$\leq 0,4$	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	$\leq 0,4$	25	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$\leq 0,4$	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	$\leq 0,4$	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Bacteroides forsythus</i>	$\leq 0,4$	100	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Bacteroides fragilis</i>	$\leq 0,4$	100	≥ 200	100	≥ 200

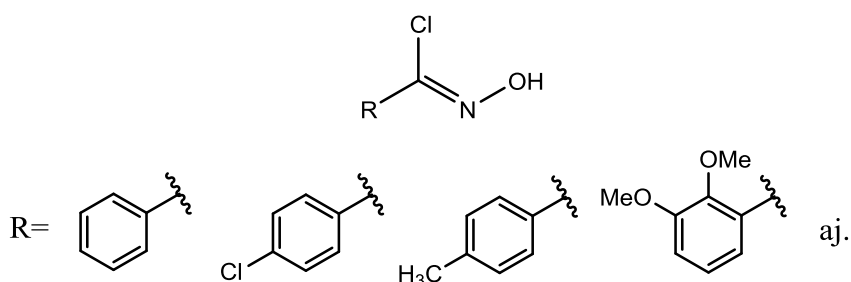
Tabulka 2

	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	A	1
Aerobní bakterie		
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 6,2$	≥ 200
<i>Corynebacterium spp.</i>	50	≥ 200
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$\leq 6,2$	25
<i>Acinetobacter baumannii</i>	$\leq 6,2$	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$\leq 6,2$	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	12,5	≥ 200

1.1.2 Antifungální aktivita

Houby jsou eukaryotní organismy a způsobují řadu lokálních i systémových onemocnění. Nejčastěji je způsobují rody *Candida* a *Aspergillus*. Ohroženi jsou především imunokompromitovaní pacienti (AIDS, leukémie), diabetici, pacienti léčení širokospektrými antibiotiky, steroidy a další. Léčba těchto onemocnění bývá spojena s řadou více problémů než u infekcí způsobených bakteriemi. Většina léčiv, která jsou používána v současné době k léčbě těchto onemocnění, jsou toxická, fungistatická a často na ně v průběhu léčby vzniká rezistence. [5,6]

Některé *N*-hydroxykarbimidoylchloridy vykazují významnou antifungální aktivitu ($MIC \leq 34 \mu\text{g/ml}$) proti kmenům *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *A. fumigatus*, *A. flavus* a *A. niger*. Na antifungální aktivitu nemají vliv elektron-donorové ani elektron-akceptorové skupiny navázané na fenylu a heteroaromatickém cyklu. Významný vliv na MIC nemají ani substituenty typu naftyl a antracyl. Alifatické *N*-hydroxykarbimidoylchloridy vykazují nižší antifungální aktivitu oproti aromatickým. Nejúčinnější sloučeninou proti *Candida* spp. a *Aspergillus* spp. je sloučenina ***N*-hydroxy-2,3-dimethoxybenzimidoylchlorid** ($MIC = 0,5 \mu\text{g/ml}$ a MFC (minimální fungicidní koncentrace) = $0,5 \mu\text{g/ml}$), přičemž *anti*-izomer je účinnější než *syn*-izomer. *N*-hydroxykarbimidoylchloridy vykazují lepší antifungální aktivitu oproti odpovídajícím oximům. [5]



příklady aktivních *N*-hydroxykarbimidoylchloridů

Mechanismus účinku *N*-hydroxykarbimidoylchloridů bude pravděpodobně založen na inhibici matrixových metaloproteinas závislých na zinečnatých a vápenatých iontech. *N*-hydroxykarbimidoylchloridy jsou silnými ligandy pro vazbu na zinek, mají selektivní vazebné vlastnosti se zinkovým aktivním místem matrixových metaloproteinas. Chovají se buď jako kompetitivní substráty nebo

přeměňují geometrii zinkového vazebného centra vazbou na zinek za vzniku pěti nebo šesti členného kruhu s jednou nebo dvěma dvojnými vazbami. [5] Pomocí těchto enzymů mohou houby štěpit kolagen a vyvolat infekci, jsou produkovány houbami jako je rod *Candida* nebo *Trichophyton* a dalšími patogeny. Matrixové metaloproteinasy jsou produkovány mnoha buňkami lidského těla, podílejí se nejen na patologických, ale i fyziologických funkcích (remodelace tkání) a jejich aktivita je regulována tkáňovými inhibitory matrixových metaloproteinas. [5,7,8]

1.1.3 Cytoprotektivní účinky derivátů

***N*-hydroxykarbimidoylchloridů**

Mezi neurodegenerativní onemocnění patří Alzheimerova nemoc, Huntingtonova chorea, Parkinsonova nemoc a prionová nemoc. Jednou z příčin těchto onemocnění je chybné svinutí (folding) proteinů, které vede k neurodegeneraci. [9]

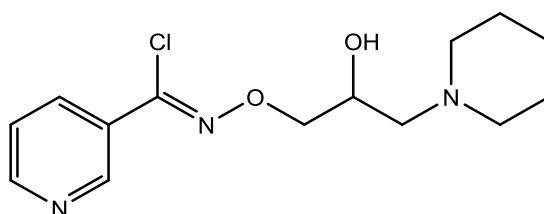
Huntingtonova nemoc je progresivní neurodegenerativní onemocnění, vyskytující se především v Jižní a Severní Americe, Austrálii a v mnoha zemích Evropy. Postihuje ženy i muže převážně ve věku 40ti let, může se projevit i dříve či později. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, jehož příčinou je mutace HD genu, která vede k rozmnožení tripletu CAG a následně k přepsání do proteinu známého jako huntingtin, obsahující abnormálně dlouhé polyglutaminové úseky. Huntingtin následně poškozuje neurony v mozku, konkrétně striatum a následně kůru, což vede k jejich zániku. [10] Mechanismus, kterým huntingtin poškozuje neurony, není zcela pochopen. Pravděpodobně se jedná o kombinaci více mechanismů. [11] Poškození a následná ztráta neuronů se projevuje afektivními, kognitivními, behaviorálními a motorickými poruchami. [10,11] Léčba tohoto onemocnění zatím neexistuje, léčí se pouze symptomy. [11]

U některých derivátů *N*-hydroxykarbimidoylchloridů bylo zjištěno, že fungují jako zesilovače chaperonů, což by mohlo být využito v léčbě neurodegenerativních onemocněních. [12] Chaperony jsou molekulární proteiny, které napomáhají dalším proteinům sbalit se během i po syntéze na ribozomu, dostat se do části buňky, kde vykonávají svoji funkci a opětovně se

svinout po denaturaci stresory. Podílejí se také na degradaci proteinů a bílkovinných agregátů a mnoho z nich patří mezi proteiny tepelného šoku (heat shock proteins), které se podílejí na zachování homeostázy a chrání buňky před stresem. [13]

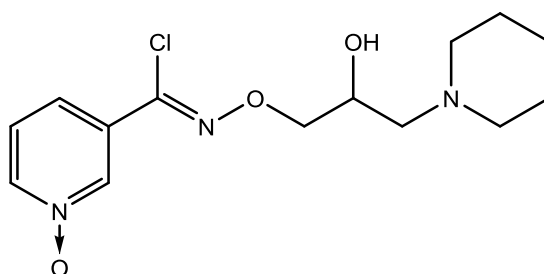
Při vývoji nových sloučenin pro léčbu neurodegenerativních onemocnění se vycházelo ze známých aktivních molekul bimoklomolu a arimoklomolu. [12]

Bimoklomol zvyšuje hladiny stresových proteinů pouze v přítomnosti stresu a zdá se být potenciálním léčivem v léčbě komplikací diabetu, konkrétně diabetické neuropatie [14] a diabetické retinopatie [15], dále by jeho účinek mohl být použit v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. [16]



bimoklomol

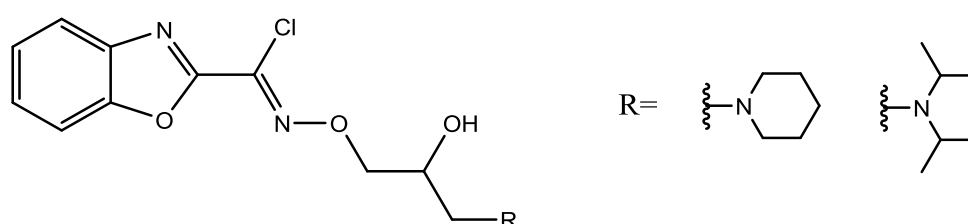
Arimoklomol také zvyšuje expresi stresových proteinů pouze v přítomnosti stresu. Má neuroprotektivní účinky, snižuje agregaci proteinů v motorických nervech, což je pravděpodobná příčina amyotrofické laterální sklerózy a zvyšuje tím přežití. Dále bylo prokázáno, že zlepšuje funkčnost svalů na modelu svalových buněk. [17,18] V současné době jsou prováděny klinické studie na arimoklomolu. Ve 2. fázi klinického hodnocení se ukázalo, že arimoklomol je pravděpodobně potenciálním léčivem pro léčbu všech forem amyotrofické laterální sklerózy. [19]



arimoklomol

Deriváty *N*-hydroxykarbimidoylchloridů také chrání pouze buňky, které jsou vystaveny stresu. Protektivní vlastnosti těchto látek byly testovány na

buňkách vystavených stresu způsobeným vyšší teplotou (41 °C) a MG-132 aktivitou. [12] MG-132 je silný a selektivní inhibitor proteasomu 26S, který umožňuje proteolýzu ubikvitin-protein komplexu a jeho inhibice může vyvolat buněčnou smrt. [20] Následně byly sloučeniny testovány na buněčných modelech pro Huntingtonovu nemoc. Výsledky prokázaly, že níže zobrazené sloučeniny chrání buňky před toxickými vlivy polyQ proteinu (huntingtin) a jejich mechanismus působení je založen na amplifikaci chaperonů. Mohou tedy být využity jako nová potenciální terapeutika pro léčbu neurodegenerativních onemocnění. [12]

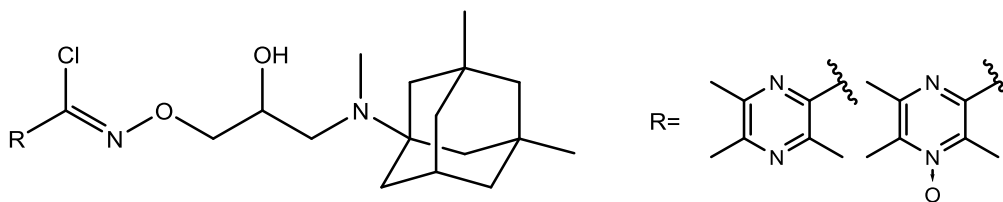


sloučeniny s cytoprotektivními účinky

Vztah struktury a aktivity:

Esenciální částí molekuly pro zvýšení hladiny proteinu tepelného šoku (chrání buňky před vysokou teplotou) a cytoprotekci před MG-132 je substituce chlorem a hydroxylem. Velmi důležitou částí aktivity molekuly je i benzoxazol. Obměna piperidinu za morfolin vede ke ztrátě HSF1 aktivity i cytoprotekce před stresem způsobeným MG-132. Vhodná se ukázala substituce piperidinu za některé acyklické aminy s kratšími řetězci. [12]

Proti účinku MG-132 byly testovány i další deriváty. Jejich struktura vycházela ze struktury bimoklomu, arimoklomu a 2,3,5,6-tetramethylpyrazinu [21], který je hlavní účinnou látkou čínského tradičního léku Chuan Xiong. Tetramethylpyrazin se používá k léčbě cévní mozkové příhody, má neuroprotektivní účinky, které jsou pravděpodobně založené na zneškodnění volných radikálů. [22] Níže zobrazené sloučeniny vykazovaly neuroprotekcii na buněčném modelu před aktivitou MG-132 pouze ve vysokých koncentracích. [21]



příklad připravených aktivních sloučenin

1.2 Chloridy jako intermediáty pro přípravu biologicky aktivních látek

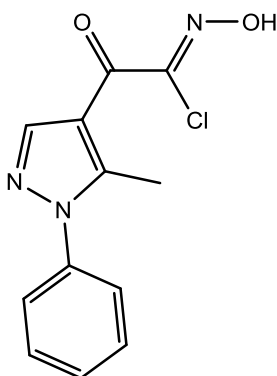
N-hydroxykarbimidoylchloridy jsou často používané intermediáty pro přípravu biologicky aktivních látek. Slouží jako výchozí látky pro syntézu sloučenin obsahujících isoxazol nebo isoxazolin. Isoxazolinové i isoxazolové deriváty vystupují v mnoha syntézách jako intermediáty pro přípravu heterocyklických sloučenin. [23–26]

1.2.1 Sloučeniny obsahující isoxazol

Isoxazolové deriváty mají antimikrobiální, antifungální, antinocicepční, antikonvulzivní, protizánětlivé, hypoglykemické, analgetické a protinádorové účinky a používají se jako herbicidy a insekticidy. [23,25]

1.2.1.1 Isoxazolopyrazoly a isoxazolo[3,4-*d*]pyridaziny

Jak již bylo zmíněno, isoxazolinové deriváty mají protizánětlivé účinky. Abdelall a kol. syntetizovali *N*-hydroxykarbimidoylchlorid, ze kterého následně připravili *C*-nitroso deriváty, isoxazolopyrazoly, isoxazolo[3,4-*d*]pyridaziny jako nová nesteroidní antiflogistika s donorovou skupinou oxidu dusnatého. [27]



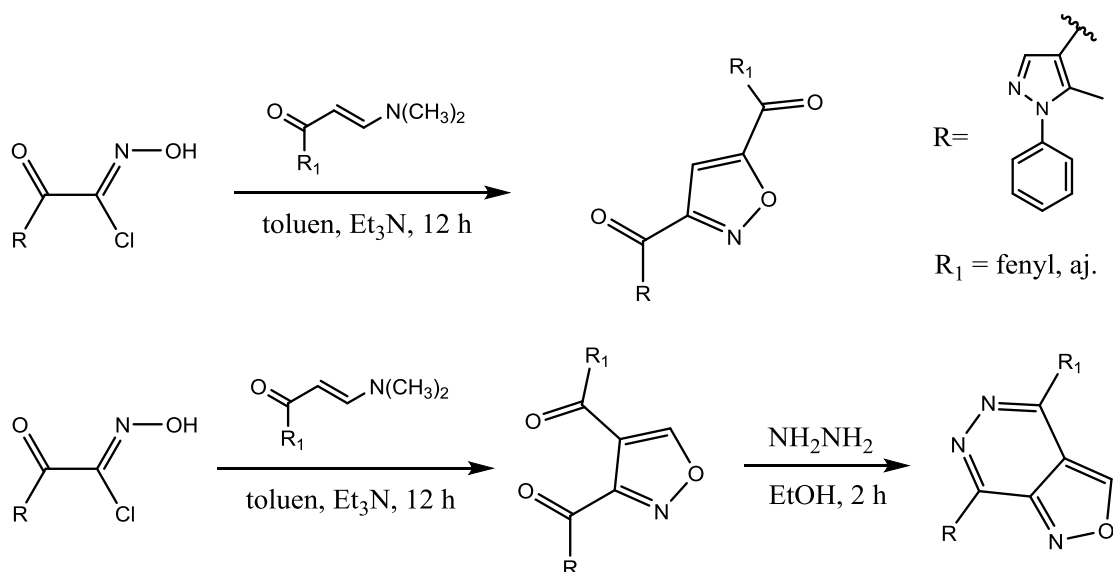
***N*-hydroxykarbimidoylchlorid**

Kombinace nesteroidního antiflogistika (NSAID) s oxidem dusnatým v jedné molekule je v současné době novým trendem. NSAID mají protizánětlivé, antipyretické a analgetické účinky. Mechanismem jejich účinku je inhibice syntézy prostaglandinů, tedy inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX). Rozlišujeme dvě izofomy tohoto enzymu – COX 1 a COX 2. COX 1 je enzym katalyzující vznik prostaglandinů, které mají fyziologickou funkci (např. ochrana žaludeční sliznice), zatímco COX 2 je zodpovědná za vznik lokálních mediátorů zánětu, bolesti a horečky. Primárním cílem NSAID je tedy COX 2. Inhibice COX 1 je spojena s nežádoucími účinky NSAID, jedná se především o jejich gastrotoxicitu a kardiovaskulární poruchy, dalšími významnými nežádoucími účinky je renální toxicita a hepatotoxicita. Z důvodu četných nežádoucích účinků neselektivních NSAID byly syntetizovány látky, které selektivně inhibují COX 2, avšak tyto látky jsou kardiotoxické, jejich nejznámějším zástupcem je celecoxib, registrovaný v ČR. [28,29]

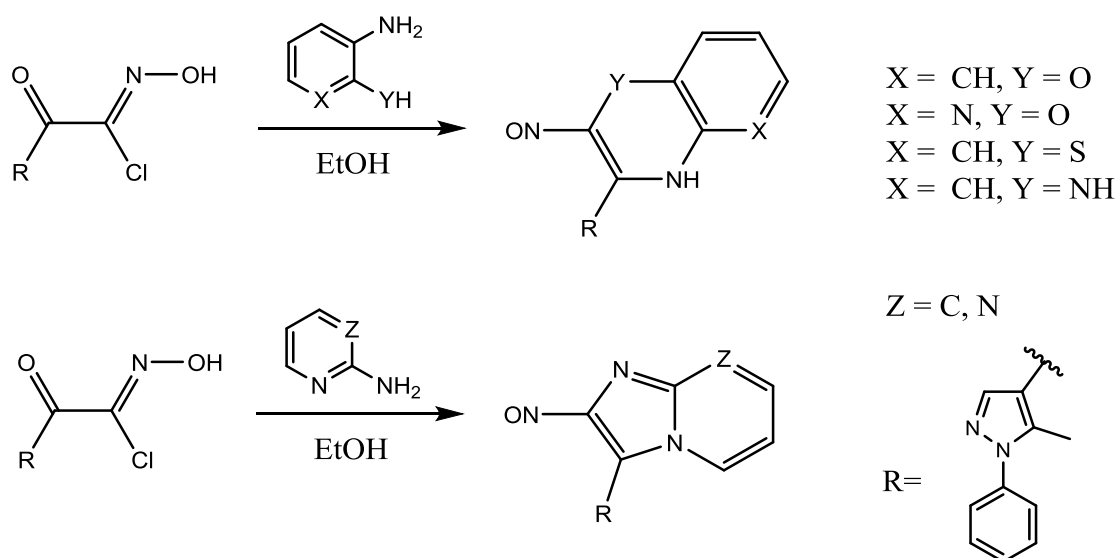
Oxid dusnatý je významnou biologicky aktivní molekulou, inhibuje agregaci trombocytů, na cévy působí vazodilatačně a hojí žaludeční sliznici. [30,31] NSAID s oxidem dusnatým mohou tedy zajistit účinnou léčbu zánětu s minimálními žaludečními a kardiologickými nežádoucími účinky. [27]

1.2.1.1.1 Struktura sloučenin a výsledky jejich testování

Obecná struktura nových sloučenin obsahuje substituovaný 1*H*-pyrazol, nitrososkupinu (nebo isoxazol) a dusík, který je součástí heterocyklu. Pyrazol je společným prvkem selektivních inhibitorů COX 2 (koxiby), nitrososkupina (nebo isoxazol) tvoří část pro vznik oxidu dusnatého. [27] V literatuře je isoxazol zmíněn jako vhodný donor oxidu dusnatého. [32]



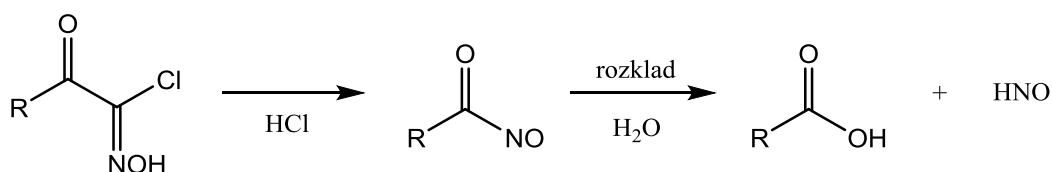
syntéza isoxazolopyrazolů a isoxazolo[3,4-d]pyridazinů



syntéza C-nitrosoderivátů

Předpokládaným účinkem nově syntetizovaných sloučenin byla inhibice převážně COX 2. Testován byl i výchozí *N*-hydroxykarbimidoylchlorid. Většina sloučenin inhibovala COX 2 a slabě COX 1 *in vitro* a v porovnání s celecoxibem byly některé sloučeniny i silnějšími inhibitory. Nejsilnějšími inhibitory byly sloučeniny obsahující ve své struktuře isoxazol a isoxazolopyridazin, navíc jsou selektivnější než celecoxib. Dále byl prokázán jejich protizánětlivý účinek. Testována byla i schopnost nově syntetizovaných sloučenin zvýšit hladinu sérového oxidu dusnatého, kde byly nejúčinnější sloučeniny z řady C-nitroso.

Isoxazolové deriváty byly mnohem lepšími donory oxidu dusnatého než isoxazolopyridazinové deriváty. U *N*-hydroxykarbimidoylchloridu byl popsán jeho mechanismus uvolnění oxidu dusnatého ve formě nitroxylu, který je jeho redukovanou formou v krvi (pH = 7,4). [27]

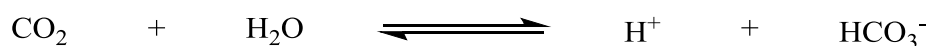


Byla porovnávána také schopnost těchto sloučenin vyvolat vředy oproti celecoxibu a indometacinu. Nejvíce zvyšuje výskyt vředů *N*-hydroxykarbimidoylchlorid, což bylo následně potvrzeno na žaludečních řezech kontrolních krys, způsobuje tak závažné vedlejší účinky. Tento účinek je způsoben pravděpodobně spontánním uvolněním kyseliny chlorovodíkové po perorálním podání. Ostatní testované sloučeniny jsou bezpečnější než induktor vředů indometacin a přibližně bezpečné jako celecoxib. [27]

1.2.1.2 Benzensulfonamidy obsahující isoxazol

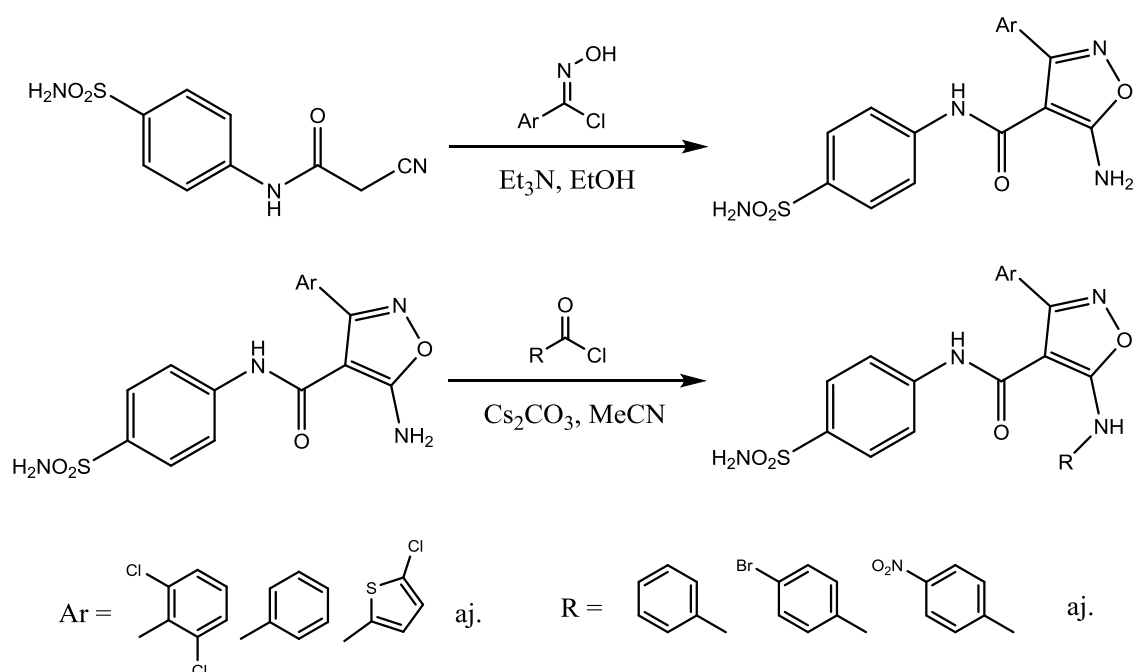
Benzensulfonamidy obsahující isoxazol jsou dalšími sloučeninami, které jsou syntetizovány z *N*-hydroxykarbimidoylchloridů. [25] Benzensulfonamidy jsou významnými látkami s antibakteriální aktivitou, dále mají protirakovinné, antikonvulzivní, antivirotické a protizánětlivé účinky. Sulfonamidová skupina je navíc klasickým inhibitorem karboanhydrasy vázající se na zinečnatý ion enzymu. Bylo již syntetizováno několik sloučenin obsahující sulfonamidovou skupinu navázanou na aromát či heterocykl s různými substituenty, jejichž účelem byla selektivní inhibice některé z izoforem karboanhydrasy. [25,33]

Karboanhydrasy jsou všudypřítomné metaloenzymy, které katalyzují fyziologickou reverzibilní reakci oxidu uhličitého a vody na proton a hydrogenuhličitan. Podílí se tak na mnoha metabolických cestách, regulaci pH, sekreci elektrolytů atd.



Existuje 16 izoforem lidských karboanhydras (CA) s různým zastoupením v tkáních. CA II se vyskytuje v erythrocytech, očích, gastrointestinálním traktu, osteoklastech, ledvinách, plicích, varleti, mozku. CA VII má zastoupení v centrálním nervovém systému. Abnormální hladina těchto enzymů bývá spojena s onemocněními, v případě CA VII je spojitost s epilepsií, aktivita CA II je spojena také s epilepsií, dále s glaukomem a edémy. Inhibitory CA jsou využívány jako diuretika, antiglaukomatika a antiepileptika. Nové inhibitory CA jsou cíleny jako antiobezitika, protinádorová léčiva a na léčbu neuropatické bolesti. Na druhou stranu je významná aktivace CA, která může být využita v léčbě onemocnění, při nichž dochází k poruše paměti a schopnosti učit se jako je Alzheimerova nemoc či stárnutí. [25,33,34]

U kombinace isoxazolu s benzensulfonamidovou skupinou v jedné molekule byly očekávány inhibiční účinky na karboanhydrasu. Altug a kol. syntetizovali dvě nové série sloučenin (s primární nebo sekundární aminoskupinou na isoxazolu) s různými substituenty a následně testovali jejich schopnost inhibovat isoenzymy karboanhydrasy I, II, IV a VII. [25]



benzensulfonamidy obsahující isoxazol a jejich příprava

Bylo prokázáno, že nově syntetizované sloučeniny inhibují izoformy enzymu karboanhydrasy *in vitro*, tento účinek byl porovnán s klinicky

používaným inhibítozem acetazolamidem, který má diuretické účinky a v současné době se používá především v léčbě glaukomu. [25,35] Deriváty obsahující nesubstituovanou aminoskupinu jsou mnohem účinnějšími inhibitory karboanhydrasy II i VII oproti sloučeninám obsahujícím substituovanou aminoskupinu. Inhibiční konstanta první série sloučenin byla v rozmezí 0,5–49,3 nM pro CA II (acetazolamid 12 nM) a 4,3–51,9 nM pro CA VII (acetazolamid 2,5 nM). Autoři se domnívají, že substituovaný benzoyl navázaný na aminoskupině je velkým substituentem, který brání vazbě sulfonamidové skupiny na enzym. Tato sterická zábrana je příčinou horší inhibice druhé série sloučenin, která je pro CA II 58,3–1778,9 nM a pro CA VII 26,8–1000,0 nM. Ostatní izoformy CA I a IV nebyly významně inhibovány syntetizovanými sloučeninami. [25]

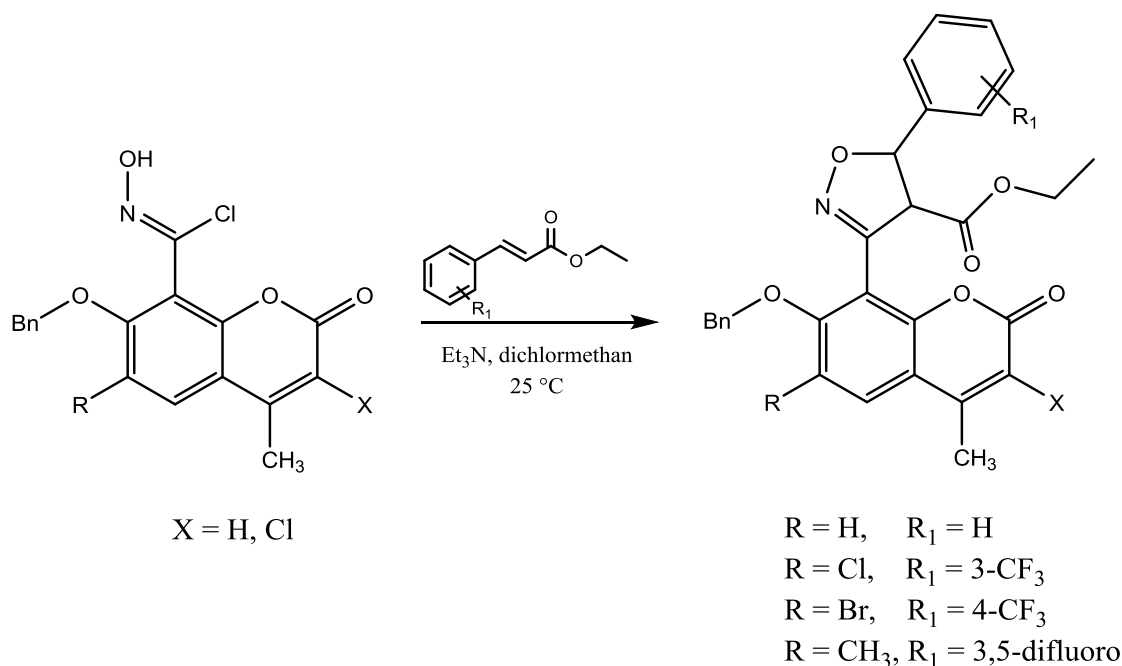
1.2.2 Sloučeniny obsahující isoxazolin

Isoxazolinové deriváty vykazují antinocicepční, antikonvulzivní, analgetické, antipsychotické a antistresové účinky. [24]

1.2.2.1 Isoxazolin-kumarinové deriváty

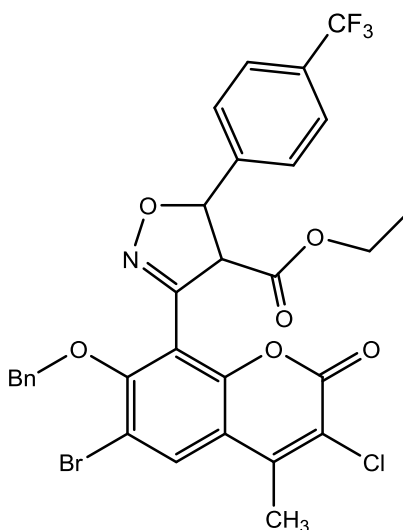
Pro syntézy heterocyklických sloučenin se používají nejen isoxazoliny, ale i kumariny, které mají významné farmakologické účinky. Nejznámějším kumarinem je warfarin, který má nezastupitelné užití jako antikoagulans. [24]

Isoxazolin-kumarinové deriváty se vyznačují dobrými antibakteriálními i antifungálními vlastnostmi. [36] Na základě tohoto poznatku se Suresh a kol. rozhodli syntetizovat nové, dosud v literatuře nepopsané deriváty. [24] Do jejich struktury jsou zakomponovány atomy halogenů, které odtahují elektrony a modifikují elektronové poměry ve sloučenině tak, aby se zvýšila afinita k cíli [24,37] a také antibakteriální potenciál sloučeniny. [38]



příprava isoxazolin-kumarinových derivátů

Antibakteriální účinky sloučenin byly testovány *in vitro* na grampozitivní bakterii (*Staphylococcus aureus*) a gramnegativní bakterii (*Escherichia coli*). Většina sloučenin vykazovala střední až vynikající aktivitu proti testovaným mikroorganismům v porovnání s chloramfenikolem. Nejúčinnější byla sloučenina **ethyl-3-(7-(benzyloxy)-6-brom-3-chlor-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-8-yl)-5-(4-(trifluormethyl)fenyl)-4,5-dihydroisoxazol-4-karboxylát**, jejíž bakteriální účinek je srovnatelný s chloramfenikolem. Autoři se domnívají, že právě brom zvyšuje její antibakteriální aktivitu. [24]



aktivní sloučenina

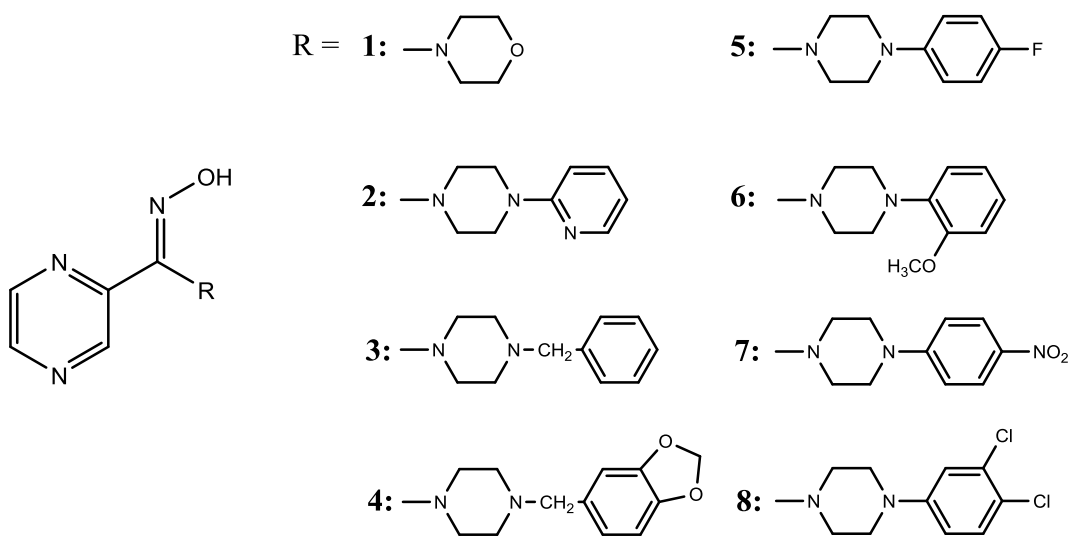
1.3 Aminoderiváty

Jak jsem již zmínila výše, *N*-hydroxykarbimidoylchloridy jsou výchozími látkami pro syntézu aminoderivátů. Některé z těchto sloučenin jsou popsány v literatuře jako biologicky aktivní sloučeniny.

1.3.1 Antibakteriální a antituberkulotická aktivita

Gobis a kol. připravili substituované (pyrazin-2-yl)methanon–oximy z *N*-hydroxykarbimidoylchloridů a popsali jejich antibakteriální vlastnosti v porovnání s metronidazolem (**M**). Zajímavou antibakteriální aktivitu ukázaly sloučeniny **1-8**, jejichž MIC je uvedena v tabulce 3. Nejlepších výsledků dosáhla sloučenina **5**, která vykazovala nejvyšší aktivitu proti testovaným anaerobním grampozitivním bakteriím (MIC \leq 6,2–25 $\mu\text{g/ml}$ proti 66 % citlivých kmenů). Gramnegativní bakterie nebyly významně inhibovány, pro většinu sloučenin byla MIC \geq 200 $\mu\text{g/ml}$. [3]

Testována byla i jejich aktivita proti aerobním bakteriím (např. *Staphylococcus aureus*), která nebyla však významná (většina sloučenin MIC \geq 200 $\mu\text{g/ml}$). Sloučeniny neprokázaly ani antimykobakteriální účinky, většina z nich měla proti *Mycobacterium tuberculosis* MIC v rozmezí 12–100 $\mu\text{g/ml}$. [3]



antibakteriálně účinné aminoderiváty

Tabulka 3

Anaerobní bakterie	MIC ($\mu\text{g/ml}$)								
	M	1	2	3	4	5	6	7	8
P_{Ma}	0,8	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	12,5	≥ 200	25	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	12,5
P_{Mi}	0,4	≥ 200	-	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$	$\leq 6,2$
AI	1,6	$\leq 6,2$	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
AN	6,2	≥ 200	$\leq 6,2$	25	25	25	12,5	≥ 200	≥ 200
PA	12,5	$\leq 6,2$	≥ 200	≥ 200	50	12,5	≥ 200	≥ 200	≥ 200

P_{Ma} = *Peptostreptococcus magnus*

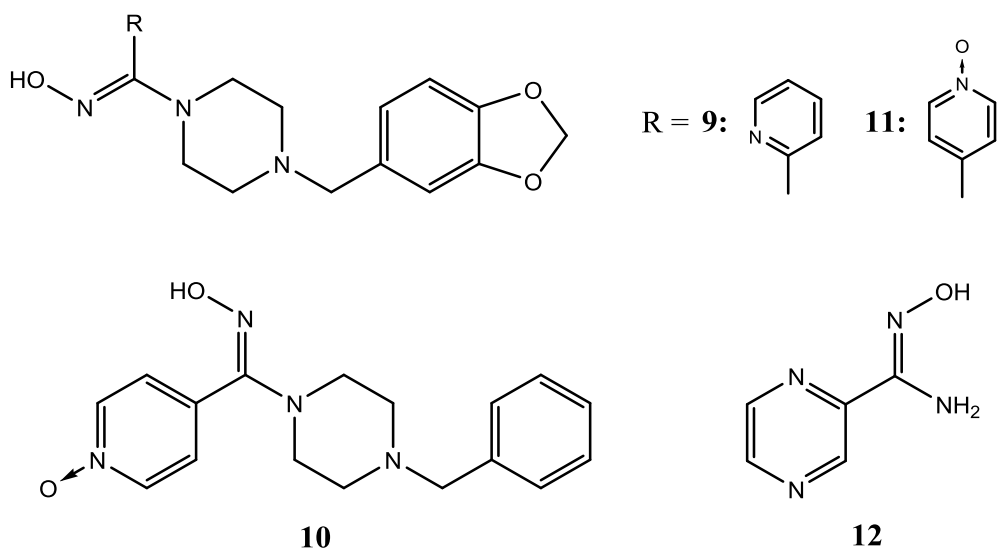
P_{Mi} = *Peptostreptococcus micros*

AI = *Actinomyces israelii*

AN = *Actinomyces naeslundii*

PA = *Propionibacterium acnes*

Gobis a kol. také připravili deriváty obsahující pyridin a pyridin-1-oxid namísto pyrazinu. Jejich antibakteriální účinky byly stanoveny *in vitro* na stejné kmeny jako pro výše uvedené deriváty, přičemž anaerobní kmeny byly citlivé především na deriváty pyridin-1-oxidu. V tabulce 4 uvádím ty nejúčinnější sloučeniny a pro porovnání i MIC *N*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (**12**), který byl ze všech testovaných sloučenin nejúčinnější proti anaerobním bakteriím. Oproti pyrazinovým derivátům jsou látky odvozené od pyridin-1-oxidu významně aktivnější i proti gramnegativním bakteriím. [2]



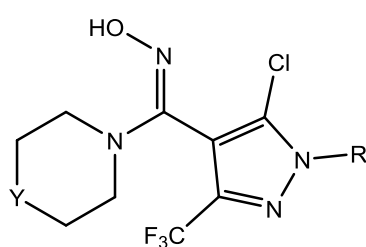
deriváty obsahující pyridin a pyridin-1-oxid

Tabulka 4

	MIC (µg/ml)				
	M	9	10	11	12
Anaerobní bakterie					
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	0,8	25	100	≥ 200	≥ 200
<i>Peptostreptococcus micros</i>	0,4	25	≤ 6,2	≤ 6,2	≤ 6,2
<i>Actinomyces israelii</i>	1,6	≤ 6,2	≤ 6,2	-	≤ 6,2
<i>Actinomyces neaslundii</i>	6,2	12,5	25	25	≥ 200
<i>Propionibacterium acnes</i>	12,5	12,5	25	≥ 200	≥ 200
<i>Prevotella bivia</i>	≤ 0,4	12,5	≤ 6,2	≤ 6,2	≤ 6,2
<i>Prevotella buccalis</i>	≤ 0,4	25	≤ 6,2	≤ 6,2	12,5
<i>Prevotella intermedia</i>	≤ 0,4	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Prevotella loescheii</i>	≤ 0,4	≥ 200	≤ 6,2	≤ 6,2	50
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	≤ 0,4	≥ 200	≤ 6,2	≤ 6,2	12,5
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	≤ 0,4	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	≤ 0,4	≥ 200	≥ 200	≥ 200	≥ 200
<i>Bacteroides forsythus</i>	≤ 0,4	≥ 200	≥ 200	50	100
<i>Bacteroides fragilis</i>	≤ 0,4	≥ 200	100	50	100

Jedinou sloučeninou inhibující aerobní bakterie byl 4-piperonylpiperazin-1-yl-pyridin-3-yl-methanon-oxim. Jeho inhibiční aktivita byla nejvyšší proti *Acinetobacter baumannii* (MIC = 50 µg/ml, pro amikacin MIC ≤ 6,2 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* a *Corynebacterium spp.* (MIC = 100 µg/ml pro oba kmeny, pro amikacin MIC ≤ 6,2 µg/ml a 50 µg/ml). Velmi slabě inhiboval také růst anaerobních bakterií. [2]

Další látky připravili Sangepu a kol., kteří syntetizovali *N*-hydroxykarbimidoylchloridy, ze kterých následně připravili různé deriváty, mezi kterými byly i (1*H*-pyrazol-4-yl)-methanon-oximové deriváty. Testovali jejich antibakteriální aktivitu proti gramnegativním bakteriím *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a grampozitivním bakteriím *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* oproti antibakteriálním léčivům ciprofloxacinu a kloxacilinu. Vyhodnocení výsledků probíhalo pomocí diskové difúzní metody. Autoři však neuvádí přesnou inhibiční aktivitu těchto sloučenin a hodnotí je obecně jako neaktivní. [25]



R = C₆H₅, Y = CH₂
 R = C₆H₅, Y = O
 R = C₆H₅, Y = CH-CH₂-C₆H₅
 R = C₆H₅, Y = N-C₆H₅
 R = 4-ClC₆H₄, Y = CH₂
 R = 4-ClC₆H₄, Y = CH-CH₂-C₆H₅
 R = 4-ClC₆H₄, Y = N-C₆H₅

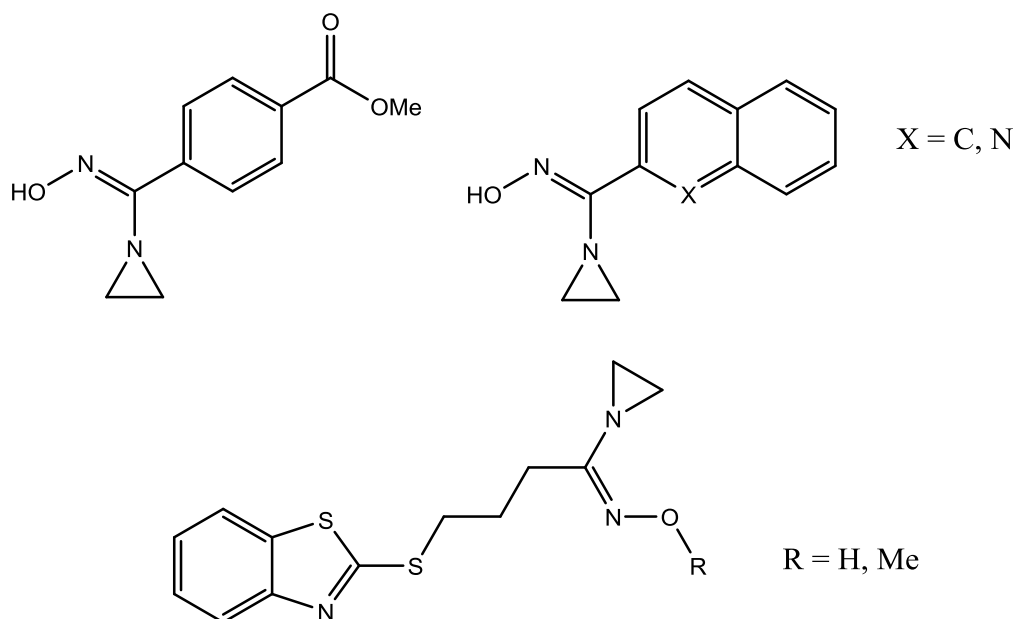
Deriváty (1*H*-pyrazol-4-yl)-methanon-oximu

1.3.2 Protinádorové účinky

1.3.2.1 Oximy substituované aziridinem

Z *N*-hydroxykarbimidoylchloridů byly připraveny sloučeniny, u kterých se předpokládá cytotoxický účinek. Jedná se o deriváty amidoximů obsahující aziridin. Jejich cytotoxická aktivita byla testována na mnoha buněčných kulturách. Testované buněčné linie zahrnovaly estrogen negativní lidský adenokarcinom prsu, lidský fibrosarkom, myší hepatocelulární karcinom, myší sarkom a další. [39,40]

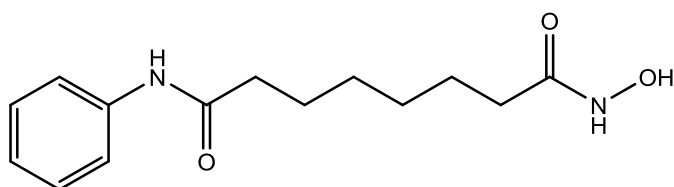
Autoři stanovili aktivitu těchto oximů substituovaných aziridinem pomocí aktivity enzymů v žijících buňkách a pomocí barvení membrán. Následně stanovili IC_{50} (koncentrace sloučeniny, která inhibuje 50 % buněk) a vypočítali z experimentů na buňkách LD_{50} (koncentrace sloučeniny, která usmrtí 50 % buněk). Slibnými sloučeninami, které vykazovaly velmi dobré cytotoxické účinky, jsou níže uvedené deriváty. Je potřeba dalšího testování těchto účinných cytotoxických látek a jejich případného využití. [39,40]



deriváty amidoximů obsahující aziridin

Na základě údajů o cytotoxicitě aziridinových derivátů bylo syntetizováno několik dalších derivátů amidoximů, jejich struktura vycházela z molekuly vorinostatu. [41] Účinek vorinostatu je založen na inhibici enzymu histondeacetylasy třídy I a II, který katalyzuje deacetylaci lysinu v histonech. Abnormální acetylace je spojena s maligními nemocemi, inhibitory histondeacetylasy jsou tedy potenciálními protinádorovými léčivy. Mají schopnost indukovat diferenciaci, apoptózu a zastavit růst. [42]

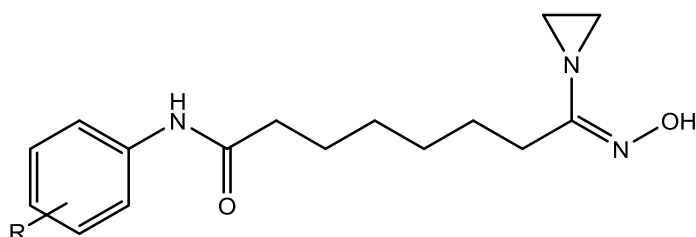
Kvůli strukturální podobnosti byla hydroxamová kyselina obsažená v molekule vorinostatu nahrazena aziridin-1-yl-alkanon-oximem. Prostřednictvím hydroxamové kyseliny se vorinostat váže na zinečnatý ion, který je obsažen v katalytickém místě histondeacetylasy, takové potenciální vlastnosti má i aziridin-1-yl-alkanon-oximová skupina. [40,41]



vorinostat

Vorinostat je registrován v USA k léčbě kožního T-buněčného lymfomu, avšak kvůli jeho schopnosti vyvolat tromboembolii není dosud registrován v Evropské unii. [43]

Strukturální analogy vorinostatu vykazují dobré cytotoxické účinky na všechny testované buněčné linie. Jejich inhibiční aktivita enzymu histondeacetylasy vzhledem k vorinostatu je nízká. To znamená, že aziridin-1-yl-alkanon-oximová skupina nevytváří kovalentní vazbu se zinečnatými ionty a proto pravděpodobně histondeacetylasa není primárním farmakologickým cílem zodpovědným za cytotoxickou aktivitu aziridin-1-yl-alkanon-oximů. V budoucnu bude snad objasněn cíl těchto sloučenin. [41]



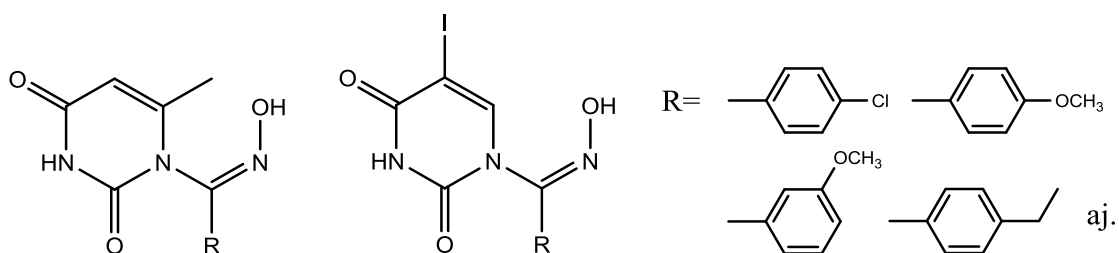
R = H, Me, Et, Cl aj.

strukturální analogy vorinostatu

1.3.2.2 Deriváty 6-methyluracil a 5-joduracil

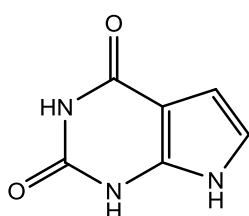
Thymidinofosforylasa katalyzuje reverzibilní fosforolýzu thymidinu na thymin a 2'-deoxy-D-ribose-1-fosfát a fosforolýzu dalších pyrimidinových nukleosidů. [44–47] Podílí se na homeostáze thymidinu a je nezbytná k metabolické aktivaci 5-fluorouracilu, pyrimidinového antimetabolitu používaného jako cytostatikum. Bylo prokázáno, že díky své enzymové aktivitě má angiogenní vlastnosti *in vivo* a stimuluje chemotaxi *in vitro*. [47] Podporuje růst nádorů a metastáz a je proto potenciálním terapeutickým cílem v léčbě rakoviny. Její zvýšená exprese byla pozorována u maligního onemocnění vaječníků, prsu, karcinomu tlustého střeva a dalších nádorů. [44–47]

Hledání nových sloučenin, které by mohly inhibovat thymidinofosforylasu, vedlo k syntéze mnoha derivátů amidoximů. K syntéze těchto látek se využívá *N*-hydroxykarbimidoylchloridů jako intermediátů pro jejich přípravu. Struktura nově syntetizovaných sloučenin vycházela ze struktury iminopyrrolidinu molekuly TPI, která reaguje s aktivní částí enzymu, podobá se jí právě část skupiny amidoximu. [48]

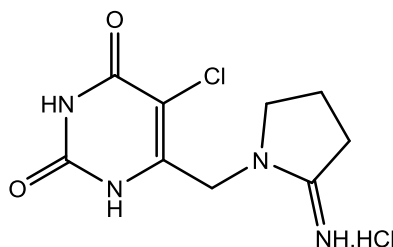


deriváty 6-methyluracilu a 5-joduracilu

Nově syntetizované sloučeniny byly podrobeny testování jejich inhibiční aktivity na thymidinofosforylase a dalším testům. Některé z nich měly dobrou inhibiční aktivitu v porovnání se známými inhibitory thymidinofosforylasy TPI a 7DX. [48] TPI ($IC_{50} = 0,035 \mu M$) je účinnějším inhibitorem než 7DX ($IC_{50} = 40 \mu M$). [44]

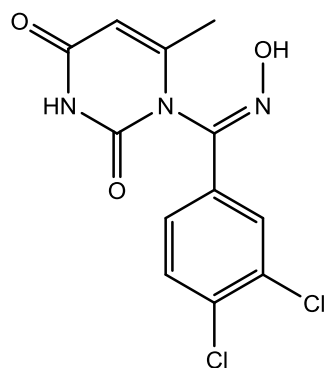


7DX



TPI

Účinnějšími inhibitory thymidinofosforylasy jsou deriváty 1-(arylaldehydoxim)-6-methyluracilu oproti derivátům 1-(arylaldehydoxim)-5-joduracilu. Nejúčinnějším inhibitorem je (*Z*)-1-[(3,4-dichlorfenyl)(hydroxyimino)methyl]-6-methylpyrimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion ($IC_{50} = 0,040 \mu M$), který byl podrobněji testován. Bylo zjištěno, že se jedná o netoxickou látku a kompetitivní inhibitor thymidinofosforylasy. Navíc inhibice angiogeneze *in vitro* tímto inhibitorem je účinnější než inhibice TPI. Nově syntetizované sloučeniny budou nadále zkoumány. [48]



silný inhibitor thymidinfosforylasy

1.3.2.3 Epakadostat

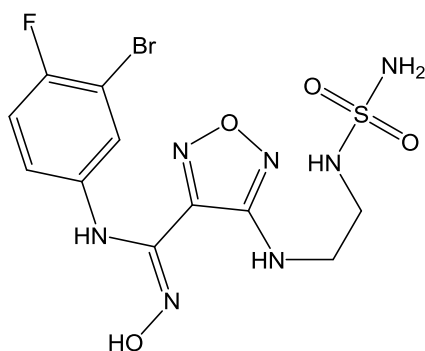
Indolamin-2,3-dioxygenasa 1 (IDO1), indolamin-2,3-dioxygenasa 2 (IDO2) a tryptofan-2,3-dioxygenasa (TDO) se podílejí na katabolismu esenciální aminokyseliny L-tryptofanu na *N*-formylkynurenin a jeho další metabolity, které inhibují proliferaci a diferenciaci T buněk, což vede k imunitní toleranci. [49–52]

IDO1 se přirozeně vyskytuje ve všech tkáních, nejvíce v tenkém střevě, plicích, nadvarleti, placentě a ženských genitáliích. [51] Jeho zvýšená přítomnost je reakcí na zánět a infekci. [49,50] Nadměrná exprese IDO1 bývá spojena s několika nemocemi, především s rakovinou a je pozorována u více typů nádoru (melanom, nádor vaječníku a tlustého střeva). [50] Díky úbytku tryptofanu a aktivitě jeho metabolitů dochází k potlačení CD8⁺ efektorových T buněk a NK buněk (přirození zabíječi), zvýšené aktivitě CD4⁺ regulačních T buněk a myeloidních supresorových buněk. [49–51] Hlavním induktorem IDO1 ve většině buněk je IFN- γ , ale i ostatní cytokiny (např. IL-6 a další) mohou také aktivovat IDO1. [50,51] Aktivita IDO1 navíc umožňuje tvorbu nových cév v nádorech prostřednictvím zánětlivých cytokinů (IFN- γ , IL-6). [49]

Ačkoliv ve většině studií je zvýšená aktivita IDO1 spojena se špatnou prognózou, některé studie poukazují na lepší prognózu. Tento rozpor je dán tím, že deplece tryptofanu také umožňuje snížení proliferace nádorových buněk. Navíc se během protinádorové odpovědi vylučuje velké množství cytokinů, které zvyšují expresi IDO1, proto by mohl být tento enzym ukazatelem protinádorové imunitní odpovědi. [51]

Nejvýznamnějším enzymem podílejícím se na metabolismu L-tryptofanu je IDO1. [50] Většina studií se proto zaměřuje na objev selektivního inhibitoru

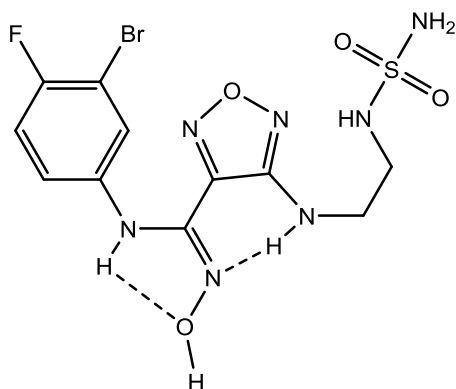
IDO1, který může také inhibovat TDO a IDO2 a tím prohloubit účinek. Slibnou sloučeninou se stala malá molekula epakadostat. [49] Syntéza epakadostatu se skládá z několika jednoduchých kroků a při jeho syntéze je využito *N*-hydroxykarbimidoylchloridu jako intermediátu pro jeho přípravu. [50]



epakadostat

Epakadostat je selektivní kompetitivní inhibitor enzymu IDO1. Podporuje růst efektorových T lymfocytů a NK buněk a snižuje přeměnu naivních T lymfocytů na regulační T lymfocyty. [49]

Zásadní pro inhibiční aktivitu epakadostatu je jeho hydroxyamidinová část, hydroxyl vytváří kovalentní vazbu s železem hemu a 4-brom-fenylový substituent se váže hluboko do aktivního místa IDO1. [49,50] Má dobrou biologickou dostupnost a permeabilitu díky dvěma intramolekulárním vodíkovým vazbám, první je mezi kyslíkem hydroxylylu a vodíkem anilinu, druhá mezi dusíkem hydroxyamidinu a sekundární aminoskupinou navázanou na furazan. Vodíkové vazby snižují polaritu molekuly a stabilizují *cis* konformaci amidinu. [50] Po perorálním podání má epakadostat dobrou biologickou dostupnost u všech druhů (potkan, pes, opice) a je velmi dobře tolerován. [50,51,53]



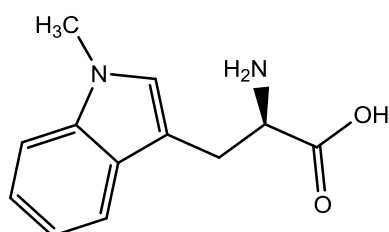
intramolekulární vodíkové vazby epakadostatu

V preklinických studiích se ukázalo, že aktivita epakadostatu je závislá na funkční imunitě, u imunokompetentních myší dokázal snížit hladinu kynureninu v plazmě a tím i růst nádoru, u imunokompromitovaných myší ne. [49] Uplatnění epakadostatu spočívá především v kombinační léčbě s protilátkami, kde jsou velmi příznivé výsledky oproti monoterapii, jak ukázaly klinické studie. Mezi používané protilátky proti PD-1 patří nivolumab, pembrolizumab a protilátky proti PD-L1 atezolizumab a durvalumab. [49,53]

V současné době probíhají studie účinku samotného epakadostatu i v kombinační terapii u melanomu, nemalobuněčného karcinomu plic, pokročilých pevných tumorů, primární peritoneální rakovině a dalších. Kombinační léčba s imunoterapií, radioterapií nebo chemoterapií může být účinná proti širokému spektru nádorů. [53]

1.3.2.3.1 Další inhibitory IDO1

Mezi další inhibitory IDO1 patří indoximod. Původně byl indoximod studován především kvůli zjištění, zda inhibice IDO1 může mít významné terapeutické účinky, poté sloužil ke zkoumání biochemické dráhy IDO a jeho vlastního účinku. [49]

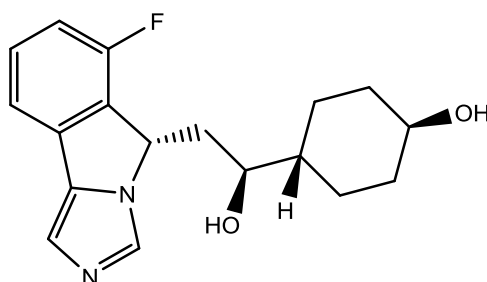


indoximod (D-1MT)

Z chemického hlediska je to 1-methyl-D-tryptofan, jeho D-izomer nemá schopnost inhibovat IDO1 na rozdíl od L-izomeru. Racemická směs má slabé inhibiční účinky. Studie přisuzují hlavní protinádorovou aktivitu D-izomeru, který se neváže ani neinhibuje IDO1. Jak ukázaly studie, tak mechanismus účinku indoximodu je založen na obnovení aktivity buněčného mTORC1 (savčí cíl rapamycinu komplex 1), který je inhibován úbytkem tryptofanu. Je zajímavé, že indoximod zmírňuje potlačení mTORC1 při nižší koncentraci lépe než samotný L-tryptofan. mTORC1 je komplex, který hraje důležitou roli v buněčném růstu a tím ovlivňuje růst T buněk. Indoximod tedy působí nepřímo na IDO1 a může být použit v kombinaci s přímými inhibitory pro zlepšení protinádorové terapie.

[49] V klinických studiích byl použit v kombinaci s protilátkami jako je ipilimumab, pembrolizumab nebo nivolumab a s dalšími látkami s různým mechanismem účinku v protinádorové terapii. [51]

Dalším inhibitorem je navoximod, nekompetitivní inhibitor IDO1 s částečnou aktivitou proti TDO. Tento jedinečný mechanismus účinku by mohl být využit u nádorů, kde je zvýšená exprese jak IDO1, tak i TDO nebo u nádorů, které jsou odolné vůči inhibici IDO1. V preklinických studiích se navoximod ukázal jako slibná sloučenina a v současné době probíhají omezené klinické studie této látky jak v monoterapii, tak i v kombinaci. [49]



navoximod

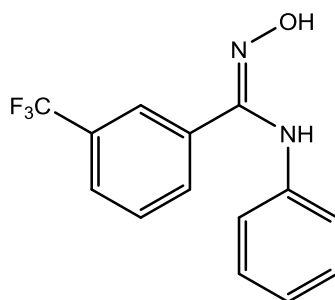
1.3.3 Antibakteriální účinky

RNA polymerasa je hlavním enzymem genové exprese nezbytným pro přežití bakterií, a proto je významným cílem působení léčiv. Mezi známé inhibitory bakteriální RNA polymerasy patří rifampicin, jenž je nezbytnou součástí léčby tuberkulózy. [54,55]

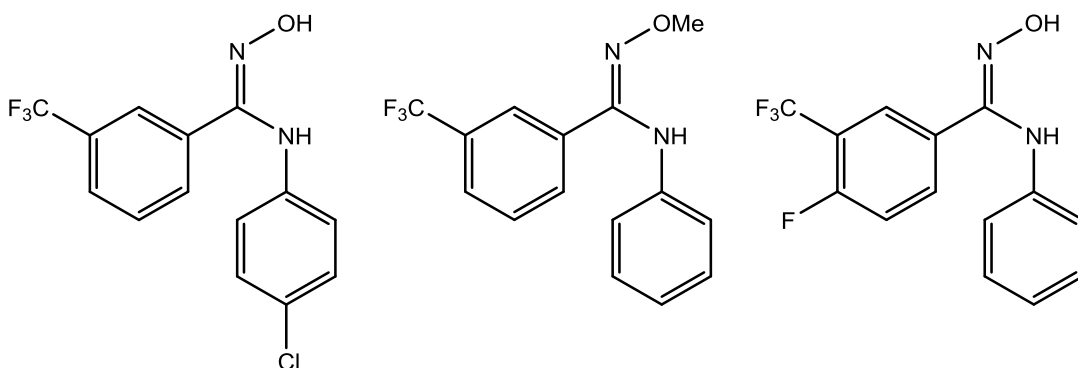
CBR hydroxyamidiny jsou malé molekuly, které inhibují katalytickou aktivitu bakteriální RNA polymerasy. Byly objeveny ve velké knihovně sloučenin při screeningu na inhibici transkripce *Escherichia coli*. [56] Modelová molekula (CBR703) inhibuje RNA polymerasu ze střevní gramnegativní bakterie, neinhibuje grampozitivní RNA polymerasu ani lidskou RNA polymerasu I., II. a III. [55,56]

Na základě inhibice biofilmu *Staphylococcus epidermidis* pomocí CBR703 a jeho derivátů [57] bylo syntetizováno několik nových derivátů modelové molekuly CBR703. Níže zobrazené sloučeniny vykazovaly antibakteriální účinky proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím, avšak byly významně cytotoxické. Autoři se domnívají, že mechanismus antibakteriálního účinku sloučenin není založen pouze na inhibici RNA

polymerasy, ale přesný mechanismus nebyl objeven. Nicméně, dle autorů docházelo k mírné precipitaci sloučenin v uvedených koncentracích, které byly použity na stanovení inhibiční aktivity sloučenin při tvorbě biofilmu *Staphylococcus epidermidis*, proto vyhodnotili tvrzení o působení na biofilm jako artefakt a tyto molekuly považují za neatraktivní pro další vývoj jako antibakteriální látky. [54]



CBR703



deriváty CBR703

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1.4 Chemická část

Tenkvrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na TLC hliníkových deskách, silikagel 60 F₂₅₄ (Merck). Jako mobilní fáze pro chloridy byla použita směs hexan–ethyl-acetát 60 : 40 (v/v) a pro aminoderiváty hexan–ethyl-acetát 80 : 20 (v/v).

Bezvodý dioxan byl k dispozici na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a byl vysušený a čerstvě nadestilovaný.

Vzorky pevných látek byly před analýzou sušeny nad oxidem fosforečným v exsikátoru při tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na přístroji SPM 20 (Stuart) a nebyly korigovány.

Pro měření elementární analýzy byl použit přístroj Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo).

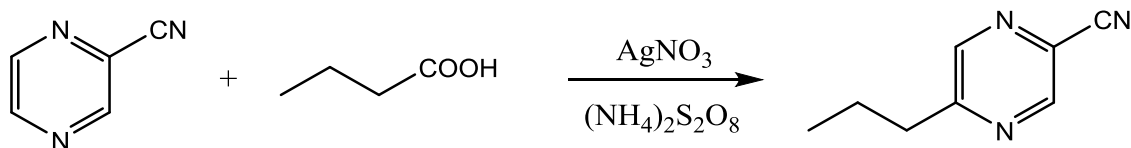
¹H NMR (500 MHz) a ¹³C NMR (125 MHz) spektra byla měřena pomocí VNMR S500. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v ppm a jsou nepřímo vztaženy na tetramethylsilan prostřednictvím signálu rozpouštědla (2,49 pro ¹H a 39,7 pro ¹³C v DMSO). Interakční potenciály *J* jsou uvedeny v Hz.

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET 6700 metodou ATR-Ge. Vlnočty jsou uváděny v cm⁻¹.

Produkty získané při syntéze *N'*-hydroxy-*N,N*-diethylpyrazin-2-karboximidamid (DEA) a 5-propylpyrazin-2-karbonitril byly čištěny na preparativním flash chromatografu CombiFlash® Rf (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA). Eluce byla gradientová, za použití hexanu (LachNer, Neratovice, Česká republika) a ethyl-acetátu (Penta, Praha, Česká republika) jako mobilní fáze.

Jako stacionární fáze se použil silikagel (0,040–0,063 nm, Merck, Darmstadt, Německo).

1.4.1 Příprava 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu



10,5 g Pyrazin-2-karbonitrilu (0,1 mol) bylo rozpuštěno v 300 ml vody zahřáté na 80 °C. K tomuto roztoku bylo přidáno 1,7 g (0,01 mol) dusičnanu stříbrného a 8,8 g (0,1 mol) kyseliny máselné. Za míchání byl přikapán roztok 25,1 g peroxidisíranu amonného v 70 ml vody. Teplota byla během přidávání udržována v rozmezí 75–80 °C. Při této teplotě byla směs míchána celkem 1 hodinu. Zchladlá reakční směs byla zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného na pH 9–10 a kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtřepek byl vysušen bezvodým síranem sodným a směs byla dvakrát přečištěna pomocí flash chromatografie. Sloučenina byla identifikována na základě porovnání TLC s dříve připravenou látkou. [58]

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

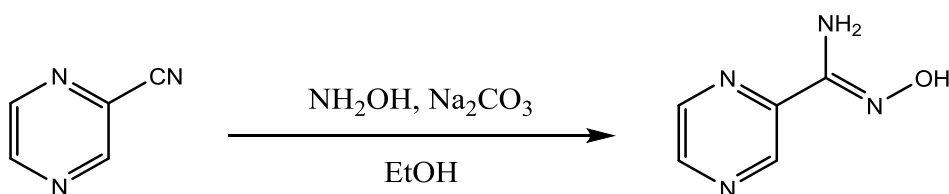
Sumární vzorec: $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3$

Molekulová hmotnost: 147,18

Výtěžek reakce je 4,6 g (31 %).

1.4.2 Příprava *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidů

1.4.2.1 *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid



6,3 g (0,06 mol) pyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 9 ml ethanolu. 8,34 g (0,12 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 9 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku pyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 12,72 g (0,12 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 75 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po

zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Pro analýzu byla sloučenina překrytalizována z bezvodého ethanolu. Sloučenina byla identifikována na základě porovnání TLC a teploty tání s dříve připravenou látkou. [59]

Vzhled: bílá krystalická látka

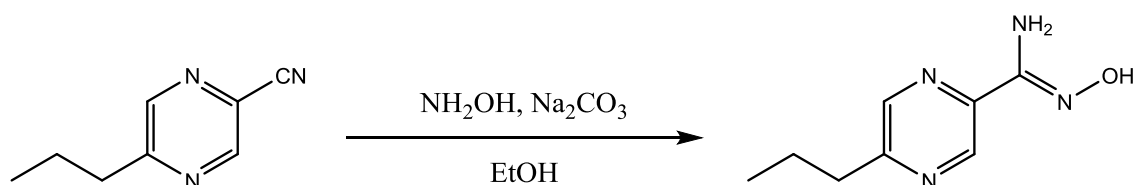
Sumární vzorec: $C_5H_6N_4O$

Molekulová hmotnost: 138,13

Teplota tání je 184–185 °C.

Výtěžek reakce je 6,48 g (78 %).

1.4.2.2 *N'*-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid



8,83 g (0,06 mol) 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 9 ml ethanolu. 8,34 g (0,12 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 9 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 12,72 g (0,12 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 75 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Pro analýzu byla sloučenina překrytalizována z bezvodého ethanolu. Sloučenina byla identifikována na základě porovnání TLC a teploty tání s dříve připravenou látkou. [59]

Vzhled: bílá krystalická látka

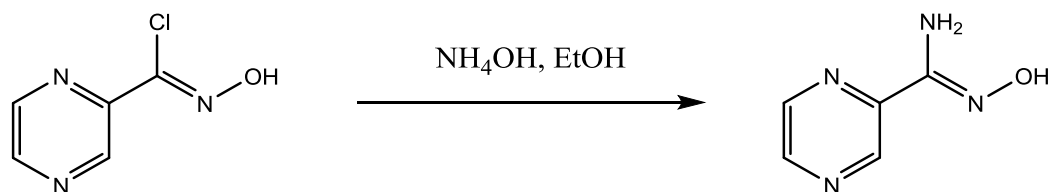
Sumární vzorec: $C_8H_{12}N_4O$

Molekulová hmotnost: 180,21

Teplota tání je 158–164 °C.

Výtěžek reakce je 6,92 g (64 %).

1.4.2.3 *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid



K roztoku 0,11 g *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchloridu (0,7 mmol) v lihu byly přikapány 2 ml koncentrovaného roztoku amoniaku (25–29%) a směs byla míchána za laboratorní teploty 2,5 hodiny. Roztok byl odpařen za vakua do sucha a následně byly přidány 2 ml vody. Vzniklé krystaly byly odsány. Sloučenina byla identifikována na základě porovnání TLC a teploty tání s dříve připravenou látkou. [60]

Vzhled: béžová krystalická látka

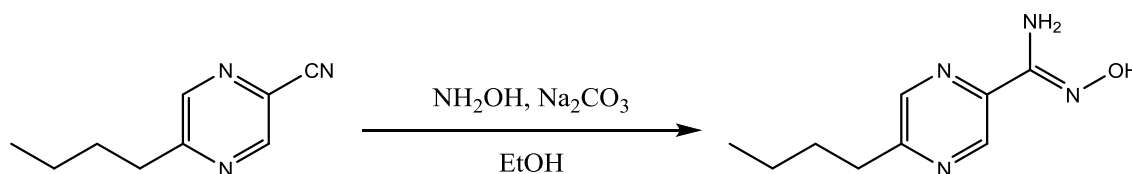
Sumární vzorec: C₅H₆N₄O

Molekulová hmotnost: 138,13

Teplota tání je 166–173 °C.

Výtěžek reakce je 0,13 g (více než 100 %).

1.4.2.4 5-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid



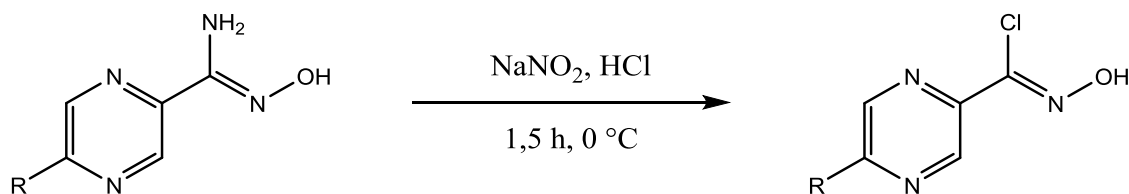
12,99 g (0,08 mol) 5-butylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 12 ml ethanolu. 11,2 g (0,16 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 12 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-butylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 17,1 g (0,16 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno ve 100 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po zchlazení byly vyloučené krystaly odsány a promyty vodou. Pro analýzu byla sloučenina překrytalizována z bezvodého ethanolu. Sloučenina byla identifikována na základě porovnání TLC a teploty tání s dříve připravenou látkou. [59]

Vzhled: bílá krystalická látka
Sumární vzorec: C₉H₁₄N₄O
Molekulová hmotnost: 194,24
Teplota tání je 154-155 °C.
Výtěžek reakce je 11,97 g (77 %).

1.4.3 Příprava chloridů

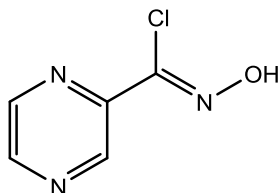
Výchozími látkami pro syntézy byl příslušný alkylovaný *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid, který je připravován na katedře Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy podle osvědčeného postupu. [59]

Obecný postup syntézy chloridů:



Příslušný *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (14,60 mmol) byl rozpuštěn v 15 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a 40 ml vody při 0 °C. Dusitan sodný (1,25 g, 18,1 mmol) v 7 ml vody byl za míchání přikapán k roztoku amidoximu. Směs se míchala 1,5 h při 0 °C a poté byl pomalu přidáván hydrogenuhličitan sodný až do dosažení hodnoty pH 3. Vyloučená sraženina byla zfiltrována, promyta ledovou vodou a usušena v exsikátoru. Následně byly produkty překrystalizovány za varu z acetonitrilu. [61]

1.4.3.1 *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-0)



K přípravě byly použity 2,00 g (*Z*)-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: bílá krystalická látka
Sumární vzorec: C₅H₄ClN₃O

Molekulová hmotnost: 157,56

Teplota tání je 130 °C za rozkladu.

Výtěžek reakce je 1,73 g (75 %).

Elementární analýza:

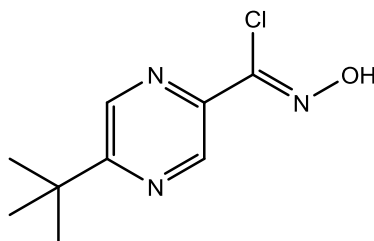
	% C	% H	% N
Vypočteno	38,12	2,56	26,67
Naměřeno	37,67	2,54	26,32

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 13.03 (1H, s, OH), 9.08 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.72-8.73 (1H, m, H5), 8.72 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 146.0, 145.4, 144.3, 142.7, 135.0

IČ spektrum: 3648 (OH), 1604 (C=N), 1170, 1151 (C=N pyrazin), 1070 (C=C pyrazin), 965 (N-O)

1.4.3.2 5-(*tert*-butyl)-*N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-1)



K přípravě bylo použito 2,83 g 5-(*tert*-butyl)-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: bílá krystalická látka

Sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$

Molekulová hmotnost: 213,67

Teplota tání je 151–154 °C.

Výtěžek reakce je 0,67 g (21 %).

Elementární analýza:

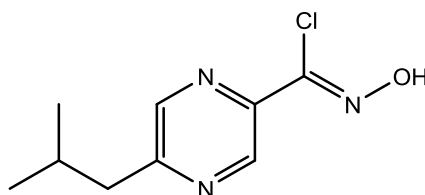
	% C	% H	% N
Vypočteno	50,59	5,66	19,67
Naměřeno	50,45	5,54	19,57

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12.90 (1H, s, OH), 8.99 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.82 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H6), 1.36 (9H, s, CH_3)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 164.4, 143.3, 140.9, 140.8, 134.9, 36.6, 29.6

IČ spektrum: 2967, 2822 (CH alif.), 1653 (C=N), 1165, 1140 (C=N pyrazin), 1044, 1013 (C=C pyrazin), 959 (N-O)

1.4.3.3 *N'*-hydroxy-5-isobutylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-2)



K přípravě bylo použito 2,3 g (11,8 mmol) *N'*-hydroxy-5-isobutylpyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: smetanová krystalická látka

Sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$

Molekulová hmotnost: 213,67

Teplota tání je 107–109 °C.

Výtěžek reakce je 2,34 g (94 %).

Elementární analýza:

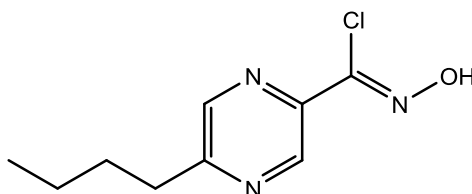
	% C	% H	% N
Vypočteno	50,59	5,66	19,67
Naměřeno	50,64	5,62	19,76

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12.88 (1H, s, OH), 8.98 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.59 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H6), 2.69 (2H, t, $J=6.8$ Hz, CH_2), 2.12-2.01 (1H, m, CH), 0.88 (6H, t, $J=6.8$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 157.3, 143.9, 143.5, 141.7, 135.0, 43.4, 28.5, 22.3

IČ spektrum: 3676 (OH), 2971, 2813 (CH alif.), 1653 (C=N), 1167 (C=N pyrazin), 1031 (C=C pyrazin), 936 (N-O)

1.4.3.4 5-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-3)



K přípravě bylo použito 2,83 g 5-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}$

Molekulová hmotnost: 213,67

Teplota tání je 128–130 °C.

Výtěžek reakce je 2,93 g (94 %).

Elementární analýza:

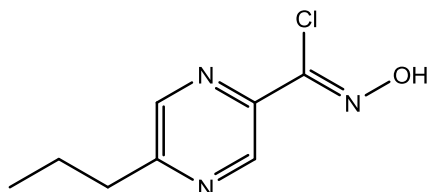
	% C	% H	% N
Vypočteno	50,59	5,66	19,67
Naměřeno	51,05	5,69	19,84

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12.87 (1H, s, OH), 8.96 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.62 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H6), 2.81 (2H, t, $J=7.6$ Hz, CH_2), 1,71-1.62 (2H, m, CH_2), 1.36-1.26 (2H, m, CH_2), 0.88 (3H, t, $J=7.6$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 158.2, 143.5, 143.5, 141.6, 135.0, 34.2, 30.8, 21.9, 13.9

IČ spektrum: 2961, 2935, 2866, 2704 (CH alif.), 1616 (C=N), 1164 (C=N pyrazin), 1015 (C=C pyrazin), 965 (N-O)

1.4.3.5 *N'*-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-4)



K přípravě bylo použito 2,15 g *N'*-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: béžová krystalická látka

Sumární vzorec: C₈H₁₀ClN₃O

Molekulová hmotnost: 199,64

Teplota tání je 142–144 °C za rozkladu.

Výtěžek reakce je 1,14 g (39 %).

Elementární analýza:

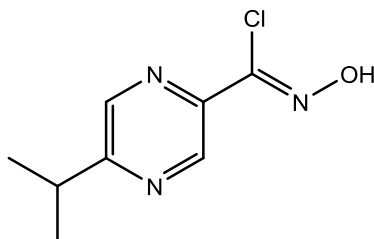
	% C	% H	% N
Vypočteno	48,13	5,05	21,05
Naměřeno	48,43	4,97	21,27

¹H NMR (500 MHz, DMSO) d 12.87 (1H, s, OH), 8.97 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H3), 8.62 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H6), 2.79 (2H, t, *J*=7.5 Hz, CH₂), 1.76-1.66 (2H, m, CH₂), 0.90 (3H, t, *J*=7.5 Hz, CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) d 158.0, 143.5, 141.7, 135.0, 36.4, 22.0, 13.7

IČ spektrum: 2963, 2933, 2820 (CH alif.), 1626 (C=N), 1171 (C=N pyrazin), 1030 (C=C pyrazin), 965 (N-O)

1.4.3.6 *N*'-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-10)



K přípravě bylo použito 2,63 g *N*'-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: smetanová krystalická látka

Sumární vzorec: C₈H₁₀ClN₃O

Molekulová hmotnost: 199,64

Teplota tání je 118–120 °C.

Výtěžek reakce je 2,01 g (69 %).

Elementární analýza:

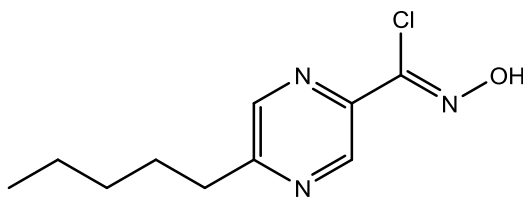
	% C	% H	% N
Vypočteno	48,13	5,05	21,05
Naměřeno	47,79	4,97	21,02

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 12.88 (1H, s, OH), 8.98 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H3), 8.66 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H6), 3.23-3.09 (1H, m, CH), 1.27 (6H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.5, 143.7, 142.4, 141.6, 134.9, 33.2, 22.0

IČ spektrum: 2978, 2822 (CH alif.), 1653 (C=N), 1172 (C=N pyrazin), 1043 (C=C pyrazin), 965 (N-O)

1.4.3.7 *N*'-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (Cl-13)



K přípravě bylo použito 3,04 g *N'*-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karboximidamidu.

Vzhled: smetanová krystalická látka

Sumární vzorec: C₁₀H₁₄ClN₃O

Molekulová hmotnost: 227,69

Teplota tání je 89–92 °C.

Výtěžek reakce je 2,43 g (73 %).

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	52,75	6,2	18,46
Naměřeno	53,26	6,12	18,66

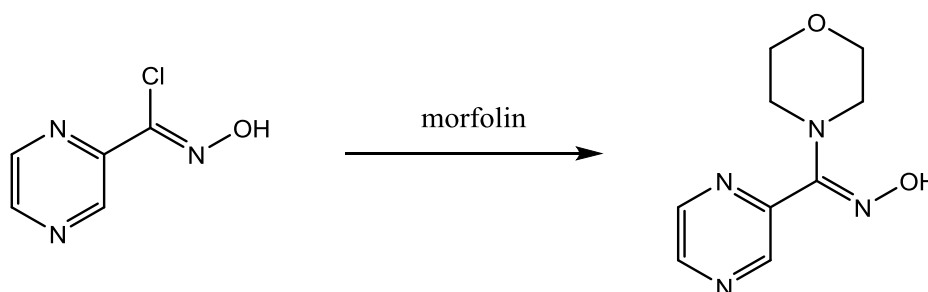
¹H NMR (500 MHz, DMSO) d 12.87 (1H, s, OH), 8.97 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H3), 8.62 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H6), 2.80 (2H, t, *J*=7.2 Hz, CH₂), 1,73-1.64 (2H, m, CH₂), 1.34-1.23 (4H, m, CH₂), 0.84 (3H, t, *J*=7.2 Hz, CH₃)

¹³C NMR (125 MHz, DMSO) d 158.2, 143.5, 143.5, 141.6, 135.0, 34.4, 31.0, 28.4, 22.0, 14.0

IČ spektrum: 2931, 2856 (CH alif.), 1653 (C=N), 1165 (C=N pyrazin), 1050 (C=C pyrazin), 962 (N-O)

1.4.4 Příprava aminoderivátů

1.4.4.1 Morfolino(pyrazin-2-yl)methanon-oxim (MOR)



0,39 g (2,5 mmol) *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchloridu bylo rozpuštěno v 5 ml bezvodého dioxanu. Následně bylo přikapáno 5 mmol morfolinu. Reakční směs byla míchána a zahřívána k varu pod zpětným chladičem v bezvodém

prostředí pod ochrannou atmosférou argonu. Celková reakční doba byla 30 minut a průběh reakce byl sledován na TLC. Po ukončení reakce byly krystaly přemístěny na fritu a rychle promyty 20 ml ledové vody. Produkt byl krystalizován za varu nejprve z cyklohexanu a nerozpuštěný zbytek z toluenu. [2]

Vzhled: žlutá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_9H_{12}ClN_4O_2$

Molekulová hmotnost: 208,22

Teplota tání je 113–116 °C.

Výtěžek reakce je 125,5 mg (21 %).

Elementární analýza:

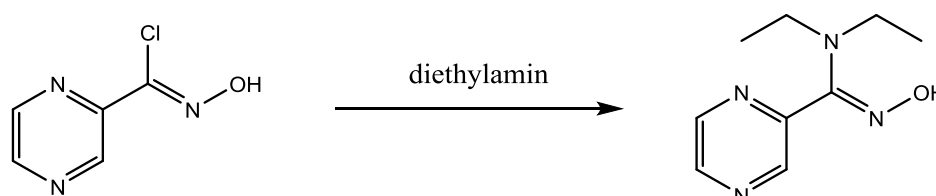
	% C	% H	% N
Vypočteno	51,92	5,81	26,91
Naměřeno	51,80	5,80	26,58

1H NMR (500 MHz, DMSO) d 9.69 (1H, s, OH), 8.75-8.74 (1H, m, H3), 8.67 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H5), 8.64 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H6), 3.61-3.57 (4H, m, OCH_2), 2.92-2.89 (4H, m, NCH_2)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) d 155.6, 146.6, 146.2, 144.9, 144.6, 65.7, 47.1

IČ spektrum: 3192 (OH), 2971, 2851 (CH alif.), 1612 (C=N), 1168 (C=N pyrazin), 1116 (C-O ether), 1061 (C=C pyrazin), 969 (N-O)

1.4.4.2 *N'*-hydroxy-*N,N*-diethylpyrazin-2-karboximidamid (DEA)



První postup:

0,39 g (2,5 mmol) *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidoylchloridu bylo rozpuštěno v 5 ml bezvodého dioxanu. Následně bylo přikapáno 5 mmol diethylaminu.

Reakční směs byla míchána a zahřívána k varu pod zpětným chladičem v bezvodém prostředí pod ochrannou atmosférou argonu. Celková reakční doba byla 30 minut a průběh reakce byl sledován na TLC. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno a ke zbytku bylo přidáno 20 ml ledové vody. Vysrážený produkt měl být odfiltrován, ale přidavkem vody se vše rozpustilo na žlutý roztok. Vytřepáváním do ethyl-acetátu ani přidavkem bazických látek (organické i anorganické) se nepodařilo získat produkt. [2]

Druhý postup:

K roztoku *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchloridu 0,11 g (0,70 mmol) v bezvodém ethanolu dostupném na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy bylo přikapáno 0,051 g (0,073 ml) diethylaminu a směs byla míchána za laboratorní teploty 2,5 hodiny. Poté byla reakční směs připravena k dělení flash chromatografií. Majoritní produkt byl odeslán na NMR analýzu, ale produkt ve spektrum potvrzen nebyl. [60]

Třetí postup:

0,39 g (2,5 mmol) *N*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchloridu a 0,40 g (5,5 mmol) diethylaminu v methanolu bylo mícháno při 0 °C 1 hodinu. Průběh reakce byl sledován na TLC. Poté byla reakční směs připravena k dělení flash chromatografií. Byly získány světle žluté krystaly s teplotou tání 76,2–80,2 °C v množství 275 mg, NMR spektrum sice odpovídalo, ale elementární analýza nikoli. Krystaly se nepodařilo překrystalizovat. [62]

1.5 Biologická část

Všechny připravené deriváty byly podrobeny testům na jejich antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivitu.

Testované sloučeniny:

- *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-0**)
- 5-(*terc*-butyl)-*N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-1**)
- *N'*-hydroxy-5-isobutylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-2**)
- 5-butyl-*N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-3**)
- *N'*-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-4**)
- *N'*-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-10**)
- *N'*-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-13**)
- Morfolino(pyrazin-2-yl)methanon–oxim (**MOR**)

1.5.1 Testování antimykobakteriální aktivity

Antimykobakteriální test byl proveden s rychle rostoucím *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo). Technika použitá pro stanovení aktivity byla mikrodiluční bujónová panelová metoda za použití 96-jamkové mikrotitrační destičky. Kultivačním médiem byl bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinhein, Německo) obohacený 0,4% glycerolem (Sigma-Aldrich, Steinhein, Německo) a 10% růstovým doplňkem Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie).

Mykobakteriální kmeny byly kultivovány na agaru Middlebrook 7H9 a suspenze byly připraveny v bujónu Middlebrook 7H9. Konečná hustota byla upravena na hodnotu v rozmezí od 0,5 do 1,0 podle McFarlandovy stupnice a zředěna v poměru 1 : 20 bujónem.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinhein, Německo) a následně byl k nim přidán Middlebrook bujón k získání koncentrace 2000 µg/ml. Ke stanovení aktivity byly použity standardy isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich, Steinhein,

Německo). Finální koncentrace byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 $\mu\text{g/ml}$ a byly dosaženy binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze. Finální koncentrace standardu ciprofloxacinu a rifampicinu byly 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 a 0,098 $\mu\text{g/ml}$. Finální koncentrace DMSO nepřekročila 2,5 % (v/v) a neovlivnila růst *M. smegmatis* ani *M. aurum*. Byly zahrnuty pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontroly.

Destičky byly zakryty polyesterovou adhezivní folií a inkubovány ve tmě bez míchání při 37 °C. Po 48 hod. inkubace *M. smegmatis*, resp. po 72 hod. inkubace *M. aurum* následovalo přidání 0,01% roztoku resazurinové sodné soli, což je barvivo, které bylo připraveno rozpuštěním resazurinové sodné soli (Sigma-Aldrich, Steinhein, Německo) v deionizované vodě tak, aby byla dosažena koncentrace roztoku 0,02%. Pak byl připraven 10% vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Steinhein, Německo). Oba roztoky byly smíchány ve stejném objemovém poměru a zfiltrány přes membránový filtr. Mikrotitrační destičky byly následně inkubovány další 2,5 hodiny pro stanovení aktivity *M. smegmatis*, resp. 4 hodiny pro *M. aurum*.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnoty byly odečteny na základě barevné změny barviva (modrá barva – aktivní sloučenina; růžová barva – neaktivní sloučenina). Hodnoty MIC pro standardy byly v rozmezí 7,81–15,625 $\mu\text{g/ml}$ pro INH; 25 $\mu\text{g/ml}$ pro RIF a 0,125–0,3125 $\mu\text{g/ml}$ pro CPX proti *M. smegmatis* a proti *M. aurum* 3,91 $\mu\text{g/ml}$ pro INH, 0,78–1,56 $\mu\text{g/ml}$ pro RIF a 0,00781–0,01563 $\mu\text{g/ml}$ pro CPX. Všechna stanovení byla provedena dvakrát. Výsledky testovaných sloučenin jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky testování antimykobakteriální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) – MIC(μg/ml)					
		CI-0	CI-1	CI-3	INH	RIF	CPX
<i>M. smegmatis</i>	48h	≥ 500	≥ 500	≥ 500	7,81	25	0,125
<i>M. aurum</i>	72h	250	250	250	3,91	0,78	0,01563
		CI-2	CI-10	CI-13	INH	RIF	CPX
<i>M. smegmatis</i>	48h	31,25	62,5	7,81	15,625	25	0,03125
<i>M. aurum</i>	72h	250	62,5	250	3,91	0,78	0,00781
		CI-4	MOR	INH	RIF	CPX	
<i>M. smegmatis</i>	48h	125	≥ 500	15,625	25	0,125	
<i>M. aurum</i>	72h	125	≥ 500	3,91	1,56	0,00781	

1.5.2 Testování antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita všech připravených sloučenin byla zkoušena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách (100 μl média a 10 μl suspenze). Byly použity kmeny z České sbírky mikroorganismů z Přírodovědecké fakulty, Masarykovy univerzity, Brno a klinické izoláty z Ústavu klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové.

Bakteriální inokula byla připravena suspendováním ve sterilním fyziologickém roztoku 0,85%. Hustota suspenze byla poté nastavena na 0,5 stupně McFarlandovy stupnice, tj. $1,5 \times 10^8$ cfu.ml⁻¹. Všechny testované kmeny byly kultivovány na Müller-Hintonově bujónu č. 2 (CAMHB, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) při 35 °C a byly uchovávány ve stejném médiu při 4 °C. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a jejich antibakteriální aktivita byla poté stanovena v Müller-Hintonově bujónu (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při pH 7,0. Kontroly obsahovaly pouze médium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřekročila 2,5 % (v/v)

a 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 vizuálně po 24 a 48 hodinách statické kultivace, ve tmě a humidní atmosféře při teplotě 35 °C. Jako standardy byly použity gentamicin (GEN) a ciprofloxacin (CPX).

Výsledky testování jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Testované kmeny:

SA (*Staphylococcus aureus* spp.*aureus*, ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016)

MRSA (*Staphylococcus aureus* spp.*aureus*, ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016)

SE (*Staphylococcus epidermidis*, klinický izolát, lab.ID 112-2016)

EF (*Enterococcus faecalis*, ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016)

EC (*Escherichia coli*, ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016)

KP (*Klebsiella pneumoniae*, klinický izolát, lab.ID 64-2016)

SEMA (*Serratia marcescens*, klinický izolát, lab.ID 62-2016)

PA (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016)

Tabulka 6: Výsledky testování antibakteriální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) – MIC/IC ₉₅ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)					
		CI-0	CI-1	CI-2	CI-3	GEN	CPX
SA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,25
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,25
MRSA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
SE	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
EF	24h	> 500	250	500	500	4	0,125
	48h	> 500	250	500	500	8	0,125
EC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,004
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,004
KP	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
SEMA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
PA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,25	0,062
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,25	0,062

Tabulka 7: Výsledky testování antibakteriální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) – MIC/IC ₉₅ (μmol.l ⁻¹)					
		CI-4	CI-10	CI-13	MOR	GEN	CPX
SA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,25
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,25
MRSA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
SE	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
EF	24h	> 500	500	> 500	> 500	4	0,125
	48h	> 500	500	> 500	> 500	8	0,125
EC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,004
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	0,004
KP	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
SEMA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	netest.	netest.
PA	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,25	0,062
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,25	0,062

1.5.3 Testování antifungální aktivity

Stanovení antifungální aktivity bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

Citlivost antifungálních kmenů na připravené látky byla hodnocena pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách (100 μl média a 10 μl suspenze). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO, jejich antifungální aktivita byla následně stanovena v tkáňovém kultivačním médiu RPMI 1640 s glutaminem 2% glukosy. Jeho pH bylo upraveno na 7,0 pomocí 0,165M 3-(N-morfolino)propansulfonové kyseliny. Hustota výsledné inokulační suspenze měla hodnotu 0,5–2 x 10⁵ CFU.ml⁻¹. Kontroly obsahovaly pouze médium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřekročila 2,5 % (v/v) celkového roztoku a neovlivňovala růst hub. Inkubace probíhala staticky, ve tmě a v humidní atmosféře při teplotě 35 °C.

Hodnoty jednotlivých minimálních inhibičních koncentrací (MIC) byly vyhodnoceny vizuálně po 24 a 48 hodinách statické kultivace. V případě *Trichophyton interdigitale* byly hodnoty MIC odečítány po 48 a 72 hodinách. Jako standardy byly použity amfotericin-B (AMF-B) a flukonazol (FLU).

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 8 a 9.

Testované kmeny:

CA (*Candida albicans*, ATCC 24433, CCM 8320, lab.ID 166-2016)

CK (*Candida krusei*, ATCC 6258, CCM 8271, lab.ID 169-2016)

CP (*Candida parapsilosis*, ATCC 22019, CCM 8260, lab.ID 167-2016)

CT (*Candida tropicalis*, ATCC 750, CCM 8264, lab.ID 170-2016)

AF (*Aspergillus fumigatus*, ATCC 204305, lab.ID 169-2017)

AFla (*Aspergillus flavus*, CCM 8363, lab.ID 174-2017)

AC (*Absidia corymbifera*, CCM 8077, lab.ID 173-2017)

TI (*Trichophyton interdigitale*, ATCC 9533, CCM 8377, lab.ID 172-2017)

Tabulka 8: Výsledky testování antifungální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)					
		CI-0	CI-1	CI-2	CI-3	AMF-B	FLU
CA	24h	> 500	> 500	> 500	250	0,06	128
	48h	> 500	> 500	> 500	250	0,25	128
CK	24h	> 500	> 500	250	250	0,25	128
	48h	> 500	> 500	250	250	1	128
CP	24h	> 500	> 500	> 500	250	0,06	16
	48h	> 500	> 500	> 500	250	0,5	16
CT	24h	> 500	> 500	> 500	250	0,12	128
	48h	> 500	> 500	> 500	250	0,5	128
AF	24h	> 500	> 500	500	250	0,25	128
	48h	> 500	> 500	500	250	1	128
Afla	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	2	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	4	128
AC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,125	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	128
TI	24h	> 500	> 500	250	250	0,5	32
	48h	> 500	> 500	250	250	1	32

Tabulka 9: Výsledky testování antifungální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)					
		CI-4	CI-10	CI-13	MOR	AMF-B	FLU
CA	24h	> 500	250	> 500	> 500	0,06	128
	48h	> 500	250	> 500	> 500	0,25	128
CK	24h	> 500	125	> 500	> 500	0,25	128
	48h	> 500	125	> 500	> 500	1	128
CP	24h	> 500	250	> 500	> 500	0,06	16
	48h	> 500	250	> 500	> 500	0,5	16
CT	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,12	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,5	128
AF	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,25	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	128
Afla	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	2	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	4	128
AC	24h	> 500	> 500	> 500	> 500	0,125	128
	48h	> 500	> 500	> 500	> 500	1	128
TI	24h	> 500	500	> 500	> 500	0,5	32
	48h	> 500	500	> 500	> 500	1	32

DISKUZE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo připravit z alkylovaných amidoximů *N'*-hydroxykarbimidoylchloridy a následně jejich aminoderiváty. Některé výchozí sloučeniny (5-propylpyrazin-2-karbonitril, *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid a alkylované amidoximy) pro syntézy jsem připravila podle postupů, které se používají na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a byly charakterizovány podle teploty tání a tenkovrstvé chromatografie pomocí standardu dostupného na katedře. 5-Propylpyrazin-2-karbonitril byl připraven radikálovou alkylací pyrazinkarbonitrilu a výtěžek reakce byl větší (31 %) než v literatuře (20 %). U alkylovaných amidoximů byly výtěžky podobné jako v literatuře. [4,58,59]

Příprava *N'*-hydroxykarbimidoylchloridů probíhala podle publikovaného postupu. [61] Při syntéze chloridů docházelo za postupného přikapávání dusitanu sodného k roztoku amidoximu ke změně zbarvení reakce z bílo-žluté až na oranžovou a poté zpět na bílo-žlutou. Při neutralizaci reakce na pH 3 pomocí nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného docházelo k bouřlivému vzniku pěny, která měnila barvu z bílé na žlutou až oranžovou a zpět. Pokud bylo dosaženo pH vyšší než 3, výtěžek reakce byl mnohem menší, v případě Cl-1 pouze 5 %, a proto jsem tento chlorid připravila dvakrát. Celkově se výtěžky této reakce pohybovaly mezi 21 až 94 % a jsou menší, než jaké získali Kočevár a kol., (48 % až 88 %). [61] Látky byly čištěny rekrystalizací.

N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid a *N'*-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid jsou v (*Z*)-izomerii, která byla určena pomocí 1D a 2D NOE experimentu, předpokládáme tedy, že i ostatní chloridy se nacházejí v (*Z*)-izomerii. [63] Ačkoliv některým autorům vznikaly oba izomery. [5]

Syntéza aminoderivátů byla obtížnější. Podařilo se připravit pouze derivát obsahující morfolin ve výtěžku 21 % (po rekrystalizaci). Při syntéze s diethylaminem byly vyzkoušeny tři postupy. V případě prvního postupu [2] došlo k rozpuštění produktu při promývání ve vodě, nejspíše došlo ke vzniku soli, ze které se však nepodařilo získat zpět aminoderivát. Při přípravě derivátu obsahujícího morfolin byla rozpustnost vyzkoušena v malém množství produktu, a proto bylo promytí vodou provedeno rychle pod vakuem s vychlazenou vodou.

Druhý postup [60] byl nejprve vyzkoušen na reakci nealkylovaného *N'*-hydroxykarbimidoylchloridu (Cl-0) s amoniakem za vzniku amidoximu. Třetí postup [62] se od druhého lišil v použitém množství diethylaminu, rozpouštědle, teplotě a reakčním čase. Směsi z druhého a třetího postupu byly následně přečištěny pomocí flash chromatografie, avšak žádná z reakcí nevedla za těchto podmínek ke vzniku *N'*-hydroxy-*N,N*-diethylpyrazin-2-karboximidamidu (DEA). Reakci by tedy bylo vhodné zopakovat v bezvodém dioxanu s následným rychlým promytím vychlazenou vodou, příp. ji vyzkoušet s jinými sekundárními aminy.

Všechny připravené sloučeniny byly testovány na jejich antibakteriální a antifungální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd. Sloučenina Cl-10 je středně účinná proti kmeni *C. krusei*. Její MIC je srovnatelná s flukonazolem, avšak příliš vysoká proti amfotericinu B.

Všechny sloučeniny byly také hodnoceny na antimykobakteriální aktivitu proti *M. smegmatis* a *M. aurum*. Sloučeniny vykazaly výraznější inhibiční aktivitu proti *M. smegmatis*, zatímco použité standardy inhibovaly efektněji *M. aurum*. Cl-2 (31,25 µg/ml) a Cl-10 (62,5 µg/ml) inhibovaly růst *M. smegmatis* řádově podobně jako rifampicin (25 µg/ml). Sloučenina Cl-13 (7,81 µg/ml) inhibovala růst *M. smegmatis* dokonce lépe než isoniazid (15,625 µg/ml). Co se týká působení na *M. aurum*, nejvýraznější aktivitu vykazala sloučenina Cl-10, čili tato látka měla na rozdíl od ostatních sloučenin podobný efekt na obě mykobakteria. Co se týká neaktivnější sloučeniny, tak pyrazinové jádro bylo substituováno pentylem, což je v sérii nejdelší alkylový řetězec. Ostatní aktivní látky nesly na pyrazinu v poloze 2 tří- až čtyřuhlíkatý řetězec, který byl na konci rozvětvený. Lipofilita neaktivnější sloučeniny (log P = 2,75) je nejvyšší oproti ostatním připraveným derivátům (log P = -0,41–2,43). Délka a lipofilita řetězce hraje jistě roli ve schopnosti prostoupit silně lipofilní stěnu mykobakterií.

ZÁVĚR

V mé diplomové práci jsem připravila 7 *N*'-hydroxykarbimidoylchloridů a 1 methanon–oxim jako deriváty amidoximů. Všechny látky byly charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektrem a jejich čistota byla ověřena tenkovrstvou chromatografií a elementární analýzou.

- *N*'-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-0**)
- 5-(*tert*-butyl)-*N*'-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-1**)
- *N*'-hydroxy-5-isobutylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-2**)
- 5-butyl-*N*'-hydroxypyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-3**)
- *N*'-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-4**)
- *N*'-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-10**)
- *N*'-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karbimidoylchlorid (**CI-13**)
- Morfolino(pyrazin-2-yl)methanon–oxim (**MOR**)

Z testovaných sloučenin byly velmi účinné proti *M. smegmatis* sloučeniny CI-13 a CI-2. Ostatní deriváty neměly významné antimykobakteriální, antibakteriální a antifungální účinky. Připravené sloučeniny budou nadále testovány na jejich antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2017*; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; ISBN 978-92-4-156551-6, online, 5. 5. 2018, dostupné na:
http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Gobis, K.; Foks, H.; Kędzia, A.; Wierzbowska, M.; Zwolska, Z. Synthesis and antibacterial activity of novel pyridine and pyrazine derivatives obtained from amidoximes. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 1271–1279.
3. Gobis, K.; Foks, H.; Kędzia, A.; Wierzchowska, M.; Kwapisz, E.; Zwolska, Z.; Augustynowicz-Kopeć, E. Studies on pyrazine derivatives. XLVII. Synthesis and antibacterial activity of novel pyrazine derivatives with amidoxime moiety. *Acta Pol Pharm* **2006**, *63*, 39–45.
4. Horká, M. Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva I. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011.
5. Ismail, T.; Shafi, S.; Singh, P. P.; Qazi, N. A.; Sawant, S. D.; Ali, I.; Khan, I. A.; Kumar, H. M. S.; Qazi, G. N.; Alam, M. S. Biologically active hydroxymoyl chlorides as antifungal agents. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **2008**, *47*, 740–747.
6. Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P. Antimykotika. In *Farmaceutická chemie IV.*; Karolinum: Praha, 2012, ISBN 978-80-246-2129-6.
7. Claveau, I.; Mostefaoui, Y.; Rouabhia, M. Basement membrane protein and matrix metalloproteinase deregulation in engineered human oral mucosa following infection with *Candida albicans*. *Matrix Biol.* **2004**, *23*, 477–486.
8. Singh, B.; Fleury, C.; Jalalvand, F.; Riesbeck, K. Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 1122–1180.
9. Giau, V. V.; Bagyinszky, E.; An, S. S. A.; Kim, S. Clinical genetic strategies for early onset neurodegenerative diseases. *Mol. Cell. Toxicol.* **2018**, *14*, 123–142.

10. Reiner, A.; Dragatsis, I.; Dietrich, P. Genetics and Neuropathology of Huntington's Disease. In *Pathophysiology, Pharmacology, and Biochemistry of Dyskinesia*; Brotchie, J., Bezard, E., Jenner, P., Eds.; Elsevier Academic Press Inc: San Diego, 2011; Vol. 98, ISBN 978-0-12-381328-2.
11. Frank, S. Treatment of Huntington's disease. *Neurotherapeutics* **2014**, *11*, 153–160.
12. Zhou, Y.; Vu, K.; Chen, Y.; Pham, J.; Brady, T.; Liu, G.; Chen, J.; Nam, J.; Reddy, P. S. M. M.; Au, Q.; Yoon, I. S.; Tremblay, M.-H.; Yip, G.; Cher, C.; Zhang, B.; Barber, J. R.; Ng, S. C. Chloro-oxime derivatives as novel small molecule chaperone amplifiers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3128–3135.
13. Macario, A. J. L.; Grippo, T. M.; de Macario, E. C. Genetic disorders involving molecular-chaperone genes: A perspective. *Genet. Med.* **2005**, *7*, 3–12.
14. Biro, K.; Jednakovits, A.; Kukorelli, T.; Hegedus, E.; Koranyi, L. Bimocloamol (BRLP-42) ameliorates peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res. Bull.* **1997**, *44*, 259–263.
15. Biro, K.; Palhalmi, J.; Toth, A. J.; Kukorelli, T.; Juhasz, G. Bimocloamol improves early electrophysiological signs of retinopathy in diabetic rats. *Neuroreport* **1998**, *9*, 2029–2033.
16. Lubbers, N. L.; Polakowski, J. S.; Wegner, C. D.; Burke, S. E.; Diaz, G. J.; Daniell, K. M.; Cox, B. F. Oral bimocloamol elevates heat shock protein 70 and reduces myocardial infarct size in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *435*, 79–83.
17. Liscic, R. M. Als and Ftd: Insights into the disease mechanisms and therapeutic targets. *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *817*, 2–6.
18. Kalmar, B.; Greensmith, L. Cellular Chaperones As Therapeutic Targets in ALS to Restore Protein Homeostasis and Improve Cellular Function. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 1-10.
19. Benatar, M.; Wu, J.; Andersen, P. M.; Atassi, N.; David, W.; Cudkovic, M.; Schoenfeld, D. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of arimocloamol in rapidly progressive SOD1 ALS. *Neurology* **2018**, *90*, 565–574.

20. Lee, D. H.; Goldberg, A. L. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 397–403.
21. Zhang, A.; Fu, P.; Zhang, Z.; Chen, H.; Yu, P. Design, Synthesis and Evaluation of Novel Chloro-oxime derivatives for Neurodegenerative Diseases. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **2016**, *6*, 31–38.
22. Zhang, Z. H.; Wei, T. T.; Hou, J. W.; Li, G. S.; Yu, S. Z.; Xin, W. J. Tetramethylpyrazine scavenges superoxide anion and decreases nitric oxide production in human polymorphonuclear leukocytes. *Life Sci.* **2003**, *72*, 2465–2472.
23. Sangepu, B.; Gandu, B.; Anupoju, G.; Jetti, V. Synthesis of Isoxazole, 1,2,4-Oxadiazole and (1H-Pyrazol-4-yl)-methanone Oxime Derivatives from N-Hydroxy-1H-pyrazole-4-carbimidoyl Chloride and their Biological Activity. *J. Heterocycl. Chem.* **2016**, *53*, 754–761.
24. Suresh, G.; Nadh, R. V.; Srinivasu, N.; Kaushal, K. Novel coumarin isoxazoline derivatives: Synthesis and study of antibacterial activities. *Synth. Commun.* **2016**, *46*, 1972–1980.
25. Altug, C.; Gunes, H.; Nocentini, A.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Supuran, C. T. Synthesis of isoxazole-containing sulfonamides with potent carbonic anhydrase II and VII inhibitory properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 1456–1464.
26. Shah, T.; Desai, V. Synthesis and antibacterial studies of some novel isoxazoline derivatives. *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 443–449.
27. Abdelall, E. K. A.; Abdelhamid, A. O. Synthesis and biological evaluations of new nitric oxide-anti-inflammatory drug hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4358–4369.
28. SPC Aclexa 100 mg tvrdé tobolky dostupné na: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0196141&tab=texts> [staženo 6.4. 2018].
29. Mohsin, N. ul A.; Ahmad, M. Hybrid organic molecules as antiinflammatory agents; a review of structural features and biological activity. *Turk. J. Chem.* **2018**, *42*, 1–20.
30. Gao, Y.-J.; Lu, C.; Su, L.-Y.; Sharma, A. M.; Lee, R. M. K. W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 323–331.

31. Paolocci, N.; Jackson, M. I.; Lopez, B. E.; Miranda, K.; Tocchetti, C. G.; Wink, D. A.; Hobbs, A. J.; Fukuto, J. M. The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *113*, 442–458.
32. Ghidini, E.; Capelli, A. M.; Carnini, C.; Cenacchi, V.; Marchini, G.; Viridis, A.; Italia, A.; Facchinetti, F. Discovery of a novel isoxazoline derivative of prednisolone endowed with a robust anti-inflammatory profile and suitable for topical pulmonary administration. *Steroids* **2015**, *95*, 88–95.
33. Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2012**, *112*, 4421–4468.
34. Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. *Future Med. Chem.* **2018**, *10*, 561–573.
35. SPC DILURAN dostupné na:
<http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0000113&tab=texts> [staženo 6.4. 2018].
36. Desai, J. T.; Desai, C. K.; Desai, K. R. A convenient, rapid and eco-friendly synthesis of isoxazoline heterocyclic moiety containing bridge at 2 degrees-amine as potential pharmacological agent. *J. Iran. Chem. Soc.* **2008**, *5*, 67–73.
37. Waring, M. J.; Ben-Hadda, T.; Kotchevar, A. T.; Ramdani, A.; Touzani, R.; Elkadiri, S.; Hakkou, A.; Bouakka, M.; Ellis, T. 2,3-bifunctionalized quinoxalines: Synthesis, DNA interactions and evaluation of anticancer, anti-tuberculosis and antifungal activity. *Molecules* **2002**, *7*, 641–656.
38. Zuo, H.; Jose, G.; Li, Z.-B.; Moon, B.-H.; Shin, D.-S.; Ghate, M. Microwave-assisted synthesis of fluorinated coumarino sulfonamides. *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.)* **2008**, 183–189.
39. Grigorjeva, A.; Jirgensons, A.; Domracheva, I.; Yashchenko, E.; Shestakova, I.; Andrianov, V.; Kalvinsh, I. Synthesis of Novel [1-Aziridinyl-(hydroxyimino) Methyl]arenes and Their Cytotoxic Activity. *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **2009**, *45*, 161–168.

40. Nikitjuka, A.; Jirgensons, A. Synthesis, Chemical and Biological Properties of Aziridine-1-carbaldehyde Oximes. *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **2014**, *49*, 1544–1559.
41. Nikitjuka, A.; Shestakova, I.; Romanchikova, N.; Jirgensons, A. Synthesis and biological evaluation of aziridin-1-yl oxime-based vorinostat analogs as anticancer agents. *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)* **2015**, *51*, 647–657.
42. Oger, F.; Lecorgne, A.; Sala, E.; Nardese, V.; Demay, F.; Chevance, S.; Desravines, D. C.; Aleksandrova, N.; Le Guevel, R.; Lorenzi, S.; Beccari, A. R.; Barath, P.; Hart, D. J.; Bondon, A.; Carettoni, D.; Simonneaux, G.; Salbert, G. Biological and Biophysical Properties of the Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid Are Affected by the Presence of Short Alkyl Groups on the Phenyl Ring. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1937–1950.
43. Questions and answers on the withdrawal of the marketing application for Vorinostat MSD dostupné na:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2010/01/WC500063048.pdf [staženo 5. 5. 2018]
44. Sun, L.; Bera, H.; Chui, W. K. Synthesis of pyrazolo[1,5-a][1,3,5]triazine derivatives as inhibitors of thymidine phosphorylase. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *65*, 1–11.
45. Moghaddam, A.; Zhang, H.; Fan, T.; Hu, D.; Lees, V.; Turley, H.; Fox, S.; Gatter, K.; Harris, A.; Bicknell, R. Thymidine Phosphorylase Is Angiogenic and Promotes Tumor-Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 998–1002.
46. Matsushita, S.; Nitanda, T.; Furukawa, T.; Sumizawa, T.; Tani, A.; Nishimoto, K.; Akiba, S.; Miyadera, K.; Fukushima, M.; Yamada, Y.; Yoshida, H.; Kanzaki, T.; Akiyama, S. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1911–1916.
47. Evrard, A.; Cuq, P.; Robert, B.; Vian, L.; Pèlegri, A.; Cano, J. P. Enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by human thymidine-phosphorylase expression in cancer cells: in vitro and in vivo study. *Int. J. Cancer* **1999**, *80*, 465–470.

48. Zhao, S.; Li, K.; Jin, Y.; Lin, J. Synthesis and biological evaluation of novel 1-(aryl-aldehyde-oxime) uracil derivatives as a new class of thymidine phosphorylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 41–51.
49. Prendergast, G. C.; Malachowski, W. P.; DuHadaway, J. B.; Muller, A. J. Discovery of IDO1 Inhibitors: From Bench to Bedside. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6795–6811.
50. Yue, E. W.; Sparks, R.; Polam, P.; Modi, D.; Douty, B.; Wayland, B.; Glass, B.; Takvorian, A.; Glenn, J.; Zhu, W.; Bower, M.; Liu, X.; Leffet, L.; Wang, Q.; Bowman, K. J.; Hansbury, M. J.; Wei, M.; Li, Y.; Wynn, R.; Burn, T. C.; Koblish, H. K.; Fridman, J. S.; Emm, T.; Scherle, P. A.; Metcalf, B.; Combs, A. P. INCB24360 (Epacadostat), a Highly Potent and Selective Indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor for Immunooncology. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 486–491.
51. Brochez, L.; Chevolet, I.; Kruse, V. The rationale of indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition for cancer therapy. *Eur. J. Cancer* **2017**, *76*, 167–182.
52. Lee, D.-H.; Lee, J.-Y.; Jeong, J.; Kim, M.; Lee, K. W.; Jang, E.; Ahn, S.; Lee, C. H.; Hwang, J. Y. Synthesis and Molecular Modeling Studies of N'-Hydroxyindazolecarboximidamides as Novel Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitors. *Molecules* **2017**, *22*, 1936.
53. Jochems, C.; Fantini, M.; Fernando, R. I.; Kwilas, A. R.; Donahue, R. N.; Lepone, L. M.; Grenga, I.; Kim, Y.-S.; Brechbiel, M. W.; Gulley, J. L.; Madan, R. A.; Heery, C. R.; Hodge, J. W.; Newton, R.; Schlom, J.; Tsang, K. Y. The IDO1 selective inhibitor epacadostat enhances dendritic cell immunogenicity and lytic ability of tumor antigen-specific T cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 37762–37772.
54. Zhu, W.; Hauptenthal, J.; Groh, M.; Fountain, M.; Hartmann, R. W. New Insights into the Bacterial RNA Polymerase Inhibitor CBR703 as a Starting Point for Optimization as an Anti-Infective Agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4242–4245.
55. Feng, Y.; Degen, D.; Wang, X.; Gigliotti, M.; Liu, S.; Zhang, Y.; Das, D.; Michalchuk, T.; Ebright, Y. W.; Talaue, M.; Connell, N.; Ebright, R. H. Structural Basis of Transcription Inhibition by CBR Hydroxamidines and CBR Pyrazoles. *Structure (Oxford, U. K.)* **2015**, *23*, 1470–1481.

56. Artsimovitch, I.; Chu, C.; Lynch, A. S.; Landick, R. A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2003**, *302*, 650–654.
57. Villain-Guillot, P.; Gualtieri, M.; Bastide, L.; Leonetti, J.-P. In vitro activities of different inhibitors of bacterial transcription against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3117–3121.
58. Opletalova, V.; Patel, A.; Boulton, M.; Dundrova, A.; Lacinova, E.; Prevorova, M.; Appeltauerova, M.; Coufalova, 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.
59. Katirtzi, A. Amidoximes as intermediates for the synthesis of potential drugs, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2015.
60. Kocevar, M.; Stanovnik, B.; Tisler, M. Syntheses and Transformations of Some 1,2,4-Oxadiazolylpyrazines. *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, *19*, 1397–1402.
61. Kočevár, M.; Polanc, S.; Sollner, M.; Tišler, M.; Verček, B. Simple Procedure for the Synthesis of Pyridinecarbohydroximoyl Chlorides and Bromides. *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 1427–1432.
62. Exner, O.; Motekov, N. Acyl Derivatives of Hydroxylamine .24. Configuration and Conformation of Amidoximes - N,N-Dialkyl Derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1982**, *47*, 814–827.
63. Gozlan, H.; Michelot, R.; Riche, C.; Rips, R. Amide-oximes: determination des configurations et etude du mecanisme de l'isomerisation Z-E. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 2535–2542.