

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

**Příprava a studium antituberkuloticky účinných
látek ze skupiny dusíkatých heterocyklů**

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

2017

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem svým kolegům a spoluautorům předložených publikací za jejich spolupráci, pomoc a podporu.

Především bych chtěl poděkovat všem současným i bývalým členům naší výzkumné skupiny v čele s prof. Alexandrem Hrabálkem, prof. Kateřinou Vávrovou, Ing. Galinou Karabanovich a doc. Věrou Klimešovou, bez kterých by práce shrnutá v této habilitační práci nemohla vzniknout.

Z dalších spolupracovníků bych chtěl vyzdvihnout a poděkovat kolegům z „Azaphthalocyanine group“, především doc. Veronice Novákové a doc. Petru Zimčíkovi, se kterými jsem mohl spolupracovat na přípravě a studiu ftalocyaninů a jejich aza-analogů.

Mnoho zajímavých výsledků pak vzniklo ve spolupráci v rámci Univerzitního výzkumného centra (UNCE) pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém. Zde bych chtěl poděkovat především doc. Tomáši Šimůnkovi, doc. Petře Kovaříkové a doc. Martinu Štěřbovi a členům jejich výzkumných týmů.

Na tomto místě musím rovněž poděkovat prof. Grigorii I. Koldobskému a Ing. Tatjaně V. Artamonové ze Sankt-Petěrburského Technologického institutu, od kterých jsem během své stáže v prvním roce postgraduálního studia získal řadu neocenitelných laboratorních dovedností a zkušeností v syntéze dusíkatých heterocyklů.

Ze současných zahraničních spolupracovníků bych chtěl za výbornou spolupráci poděkovat především doc. Kataríně Mikušové z Univerzity Komenského v Bratislavě a doc. Leonidu V. Myznikovi ze Sankt-Petěrburské Státní univerzity průmyslových technologií a designu.

Nakonec bych chtěl poděkovat svým blízkým za neocenitelnou podporu a pochopení.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	9
1.1.	Tuberkulóza.....	9
1.2.	Současná terapie tuberkulózy.....	12
1.3.	Vývoj nových antituberkulotik.....	13
2.	KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM.....	18
2.1.	Syntéza a funkcionalizace dusíkatých heterocyklů.....	20
2.1.1.	Syntéza a funkcionalizace 5-substituovaných tetrazolů.....	20
2.1.2.	Syntéza a funkcionalizace 1-substituovaných-1 <i>H</i> -tetrazol-5-thiolů a jejich selenových analogů.....	24
2.1.3.	Syntéza a funkcionalizace 5-substituovaných 1,3,4-oxadiazol-2-thiolů a 1,3,4-thiadiazol-2-thiolů.....	26
2.2.	Studium vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální účinností u nitro-substituovaných <i>N</i> -heterocyklických sloučenin.....	28
2.2.1.	Antimykobakteriálně účinné dinitrobenzylsulfanyl-substituované heteroaromatické sloučeniny.....	28
2.2.2.	Antimykobakteriálně účinné dinitrofenyl-substituované heteroaromatické sloučeniny.....	34
3.	SOUHRN, ZÁVĚRY A MOŽNÉ SMĚRY DALŠÍHO VÝZKUMU.....	38
4.	Seznam zkratk.....	40
5.	LITERATURA.....	41
5.1.	Citace vlastních prací.....	41
5.1.1.	Původní práce.....	41
5.1.2.	Přehledové práce.....	42
5.1.3.	Patenty a patentové přihlášky.....	43
5.2.	Citace literatury ostatních autorů.....	44

6.	PODÍL PŘEDKLADATELE HABILITAČNÍ PRÁCE NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH	49
6.1.	Původní práce	49
6.2.	Přehledové práce	49
6.3.	Patenty	49
6.4.	Původní práce nezahrnuté v habilitační práci	50
7.	SOUBOR PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ	55
	P1. Myznikov, L. V.; Roh, J.; Artamonova, T. V.; Hrabalek, A.; Koldobskii, G. I. Tetrazoles: LI. Synthesis of 5-substituted tetrazoles under microwave activation. <i>Russ. J. Org. Chem.</i> 2007 , <i>43</i> , 765-767.....	56
	P2. Roh, J.; Artamonova, T. V.; Vavrova, K.; Koldobskii, G. I.; Hrabalek, A. Practical Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles under Microwave Irradiation. <i>Synthesis</i> 2009 , 2175-2178.	56
	P3. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot regioselective vinylation of tetrazoles: preparation of 5-substituted 2-vinyl-2 <i>H</i> -tetrazoles. <i>Tetrahedron Lett.</i> 2010 , <i>51</i> , 1411-1414.	56
	P4. Novakova, V.; Roh, J.; Gela, P.; Kunes, J.; Zimcik, P. Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. <i>Chem. Commun.</i> 2012 , <i>48</i> , 4326-4328.	56
	P5. Karabanovich, G.; Roh, J.; Padelkova, Z.; Novak, Z.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot synthesis of 1-substituted-5-alkylselenanyl-1 <i>H</i> -tetrazoles from isoselenocyanates: unexpected formation of <i>N</i> -alkyl- <i>N</i> -arylcyanamides and (<i>Z</i>)- <i>Se</i> -alkyl- <i>N</i> -cyano- <i>N,N'</i> -diarylisoselenoureas. <i>Tetrahedron</i> 2013 , <i>69</i> , 8798-8808.	56
	P6. Myznikov, L.; Dmitrieva, U.; Artamonova, T.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Zevatskii, Y. An Efficient Synthesis of 1-Substituted 5-Bromo-1 <i>H</i> -tetrazoles. <i>Synthesis</i> 2013 , <i>45</i> , 2029-2033.	57
	P7. Karabanovich, G.; Roh, J.; Smutný, T.; Němeček, J.; Vicherek, P.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Dufková, I.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. 1-Substituted-5-[(3,5-Dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -Tetrazoles and Their Isosteric Analogs: A New Class of Selective Antitubercular Agents Active	

- against Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 324-340.....57
- P8. Karabanovich, G.; Roh, J.; Soukup, O.; Pávková, I.; Pasdiorová, M.; Tambor, V.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. Tetrazole Regioisomers in the Development of Nitro Group-Containing Antitubercular Agents. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 174-181.....57
- P9. Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-Oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362–2380.57
- P10. Karabanovich, G.; Němeček, J.; Valášková, L.; Carazo, A.; Konečná, K.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Pavliš, O.; Pávek, P.; Vávrová, K.; Roh, J.; Klimešová, V. S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 369-383.58
- P11. Němeček, J.; Sychra, P.; Macháček, M.; Benková, M.; Karabanovich, G.; Konečná, K.; Kavková, V.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Soukup, O.; Roh, J.; Klimešová, V. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *130*, 419-432. 58
- P12. Roh, J.; Karabanovich, G.; Vlčková, H.; Carazo, A.; Němeček, J.; Sychra, P.; Valášková, L.; Pavliš, O.; Stolaříková, J.; Klimešová, V.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Hrabálek, A. Development of Water-Soluble 3,5-Dinitrophenyl Tetrazole and Oxadiazole Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.08.01058
- P13. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6101-6118.....59

P14. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný tetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305622 B6, 2016.	59
P15. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný diazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305680 B6, 2016.	59
P16. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Oxa- and thia-diazoles useful in the treatment of Tuberculosis. Patent WO2014/161516 A1, 2014.....	59
P17. Karabanovich, G.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Pávek, P. Dinitrofenyloxadiazol nebo -triazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306408 B6, 2017.	59
P18. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituovaný fenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306245 B6, 2016.	59
P19. Němeček, J.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P. Substituovaný dinitrofenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306321 B6, 2016.	59
P20. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituted phenyltetrazole, its use and pharmaceutical preparation containing it. Patent WO2016/091228 A1, 2016.....	60
P21. Čonka, P.; Hrabálek, A.; Karabanovich, G.; Němeček, J.; Klimešová, V.; Valášková, L.; Roh, J. Substituovaný nitrobenzyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Přihláška vynálezu PV 2015-444, 2015.	60

1. ÚVOD

Předložená habilitační práce shrnuje výsledky dosažené v oblasti syntézy dusíkatých heterocyklů a studia vztahů mezi jejich strukturou a antituberkulotickou účinností. Z tohoto důvodu budou úvodní kapitoly věnovány tuberkulóze, v současnosti používaným antituberkulotikům a především těm v současnosti vyvíjeným.

1.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je celosvětově rozšířená infekční choroba způsobená mykobakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* complex. V 99% případů je původcem právě *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Přestože je možná vakcinace BCG-vakcínou a již od 80. let 20. století je známá účinná léčba TB spočívající v podání čtyřkombinace léků isoniazidu (INH), rifampicinu (RIF), ethambutolu (EMB) a pyrazinamidu (PZA), představuje TB i ve 21. století významnou hrozbu. Dle světové zdravotnické organizace (WHO) bylo v roce 2015 celosvětově zaznamenáno 10,4 milionu nových případů, 60 % z nich v šesti nejvíce zasažených státech: Indii, Indonésii, Číně, Nigérii, Pákistánu a Jihoafrické republice. V roce 2015 pak WHO zaznamenala 1,8 milionu úmrtí v přímém důsledku TB, což celosvětově řadí TB mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí.^{1,2}

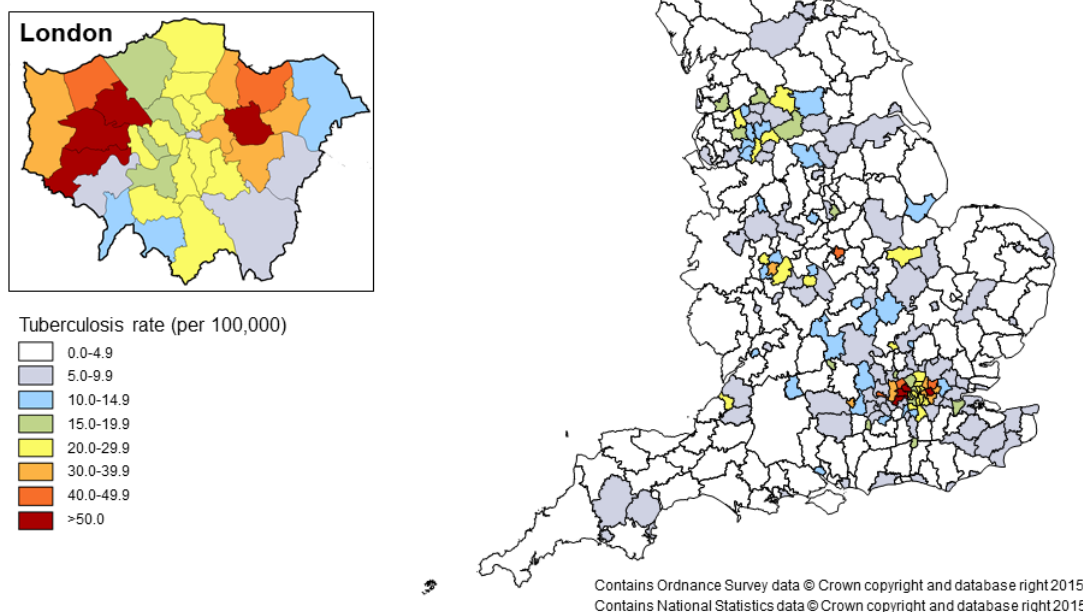
Patogenem *M. tuberculosis* je nakažena celá jedna třetina lidské populace a u těchto lidí probíhá tzv. latentní forma TB. U většiny nakažených nedojde během života k rozvoji aktivní formy TB. Pravděpodobnost aktivace a rozvoje TB je asi 10 %, avšak u lidí se sníženou imunitou, především u HIV-pozitivních či lidí trpících diabetem, je tato pravděpodobnost podstatně vyšší. U HIV-pozitivních pacientů představuje TB nejčastější příčinu úmrtí, v roce 2015 to bylo ve 400 tis. případech. Bez adekvátní léčby umírá v důsledku TB asi 45 % HIV-negativních pacientů a prakticky všichni HIV-pozitivní.^{1,2}

I ve vyspělých zemích s kvalitním zdravotnickým systémem však představuje TB vážnou hrozbu. Mohou za to multilékově rezistentní (MDR) kmeny a extenzivně rezistentní (XDR) kmeny mykobakterií. MDR kmeny jsou rezistentní ke dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům první linie, k INH a RIF, zatímco XDR kmeny jsou rezistentní ke všem léčivům první linie a navíc i k rezervním antituberkulotikům, především k fluorochinolonům a nejméně k jednomu injekčnímu antituberkulotiku. Dle WHO se v roce 2015 objevilo 480 tis. nových případů MDR TB a 9,5 % z nich bylo XDR TB. K léčbě

těchto forem je nutno využívat antituberkulotik druhé volby, které je navíc nutné podávat až 2 roky, což vede k rozvoji významných nežádoucích účinků a často je taková terapie neúspěšná. V současné době je úspěšně léčeno pouze 52 % pacientů s MDR formou TB a 28 % s XDR formou TB.¹

Jak nedávno publikoval Philippe Douste-Blazy, toho času předseda organizace Unitaid, třináctiletý Ernest z Keni, který trpěl lékově rezistentní formou TB, musel užít celkem 14 600 tablet antituberkulotik během dvouleté terapie.³ A to byl jedním ze šťastnějších, jelikož pro něj byla racionální a účinná terapie k dispozici. Intenzivní migrace, která v posledních letech v Evropě probíhá, s sebou přináší výrazně zvýšené riziko zavlečení těchto lékově rezistentních forem do Evropy. Především velká západoevropská města se stávají rezervoárem různých forem TB. Velmi vypovídající je současná situace v Londýně, kde v některých čtvrtích přesahuje prevalence TB prevalenci ve Rwandě, Súdánu či Číně, tedy ve státech s vysokým výskytem TB (Obrázek 1).⁴

Three-year average TB rates by local authority district, England, 2013-2015



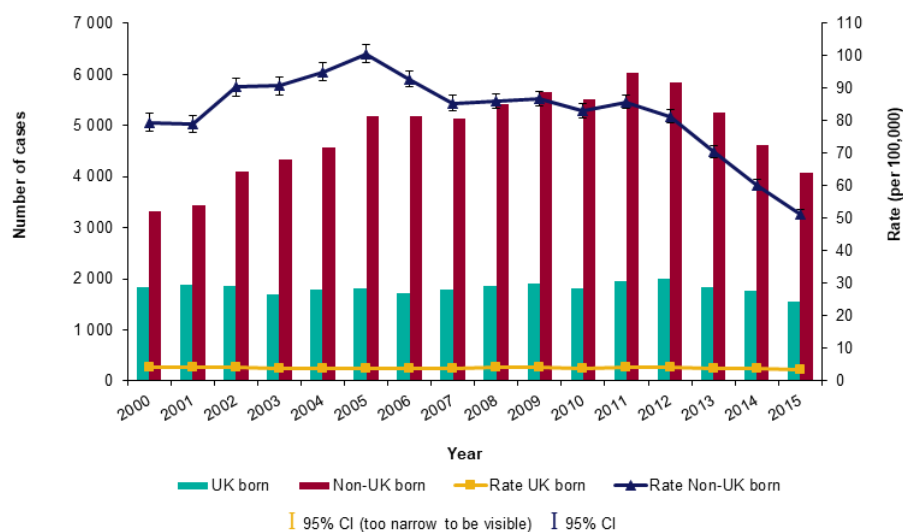
3 Tuberculosis in England: 2016 report

Source: Enhanced Tuberculosis Surveillance system (ETS), Office for National Statistics (ONS)
Data extracted: April 2016
Prepared by: TB Section, National Infection Service, Public Health England

Obrázek 1. Prevalence TB v Anglii, se zvětšenou oblastí Londýna. Převzato z Public Health England, Tuberculosis in England: annual report⁴

Jako důkaz vlivu intenzivní migrace obyvatel pak může posloužit údaj o původu pacientů trpících TB na území Anglie (Obrázek 2). Prevalence TB mezi obyvateli narozenými mimo území Spojeného Království je několikanásobně vyšší.⁴

TB case notifications and rates by place of birth, England, 2000-2015



Obrázek 2. Počty případů TB a její prevalence v Anglii na základě místa narození postižených. Převzato z Public Health England, Tuberculosis in England: annual report⁴

Naproti tomu situace v České republice je relativně dobrá. V roce 2016 bylo hlášeno celkem 517 onemocnění tuberkulózou, tj. 4,9 případu na 100 000 obyvatel. Z tohoto počtu představoval podíl cizinců s TB 30 % (nejvíce z Ukrajiny, Slovenska, Vietnamu a Rumunska). 23 případů pak představovaly formy TB s mono či multilékovou rezistencí.⁵

1.2. Současná terapie tuberkulózy

V současné době používaná léčiva můžeme rozdělit do 5 skupin (Tabulka 1). Doporučený postup pro léčbu pulmonální TB zůstává již mnoho let nezměněn, a to i přes snahy nahradit EMB některým z fluorochinolonů. Jedná se o dvouměsíční podávání čtyřkombinace INH, RIF, PZA a EMB následované čtyřmi měsíci terapie INH a RIF.⁶

Tabulka 1. V současné době používaná antituberkulotika první volby⁶ a skupiny antituberkulotik A-D pro léčbu MDR a XDR TB.⁷

1 - Perorální léčiva první volby	<ul style="list-style-type: none">• isoniazid (INH)• rifampicin (RIF)• pyrazinamid (PZA)• ethambutol (EMB)	
A - Fluorochinolony	<ul style="list-style-type: none">• levofloxacin• moxifloxacin• gatifloxacin	
B – Injekční antituberkulotika	<ul style="list-style-type: none">• amikacin• capreomycin• kanamycin	
C – Další základní antituberkulotika druhé linie	<ul style="list-style-type: none">• ethionamid / prothionamid• cykloserin / terizidon• linezolid• clofazimin	
D – Příkladná antituberkulotika	D1	<ul style="list-style-type: none">• vysoké dávky isoniazidu• pyrazinamid• ethambutol
	D2	<ul style="list-style-type: none">• bedaquilin• delamanid
	D3	<ul style="list-style-type: none">• p-aminosalicylová kys.• imipenem–cilastatin• meropenem• amoxicillin-klavulanát

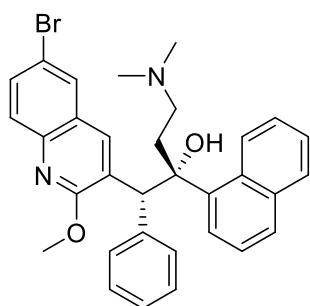
U MDR forem TB je pak situace daleko komplikovanější. Doporučuje se terapie alespoň pěti antituberkulotiky účinnými proti danému kmeni. Optimálně by kombinace měla obsahovat PZA, a dále jedno léčivo ze skupiny A, jedno z B a dvě z C. Pokud není

možné vzhledem k resistenci daného kmene dosáhnout počtu 5 antituberkulotik pomocí výše uvedeného schématu, je možné doplnit léčiva z D2 či D3. Intenzivní fáze by měla trvat 8 měsíců a celkově by terapie měla trvat 20 měsíců. Nově WHO připouští možnost zkrácení terapie na 9-12 měsíců u pacientů, kteří dosud nebyli léčeni antituberkulotiky druhé volby, a jejichž TB není resistantní vůči léčivům ze skupin A a B.⁷

Jak vyplývá z výše uvedeného, výzkum a vývoj nových antituberkulotik je vysoce žádoucí. Nová léčiva by měla napomoci zkrácení a zefektivnění terapie proti citlivým i resistantním formám TB.

1.3. Vývoj nových antituberkulotik

Nově vyvíjená antituberkulotika by měla splňovat následující kritéria: a) musí být účinnější než v současnosti používaná antituberkulotika; b) měla by mít nový mechanismu účinku – tzn. být účinná proti MDR a XDR kmenům; c) měla by být kompatibilní s antiretrovirální terapií (vzhledem k časté HIV koinfekci); d) měla by být účinná na latentní formy TB. V posledních letech se začala vývoji antituberkulotik věnovat zvýšená pozornost a výsledkem je několik skupin velmi nadějných antituberkulotik, z nichž bedaquilin a delamanid již byly schváleny pro léčbu zvláště závažných forem MDR TB (viz Tabulka 1, D2). Na obrázku 4 je přehled nových antituberkulotik ve fázi preklinického a klinického vývoje.⁸ Kromě nových chemických entit jsou ve fázi klinického vývoje i nové kombinace již známých antituberkulotik či nové užití již známých léčiv jako



Bedaquilin (TMC-207)

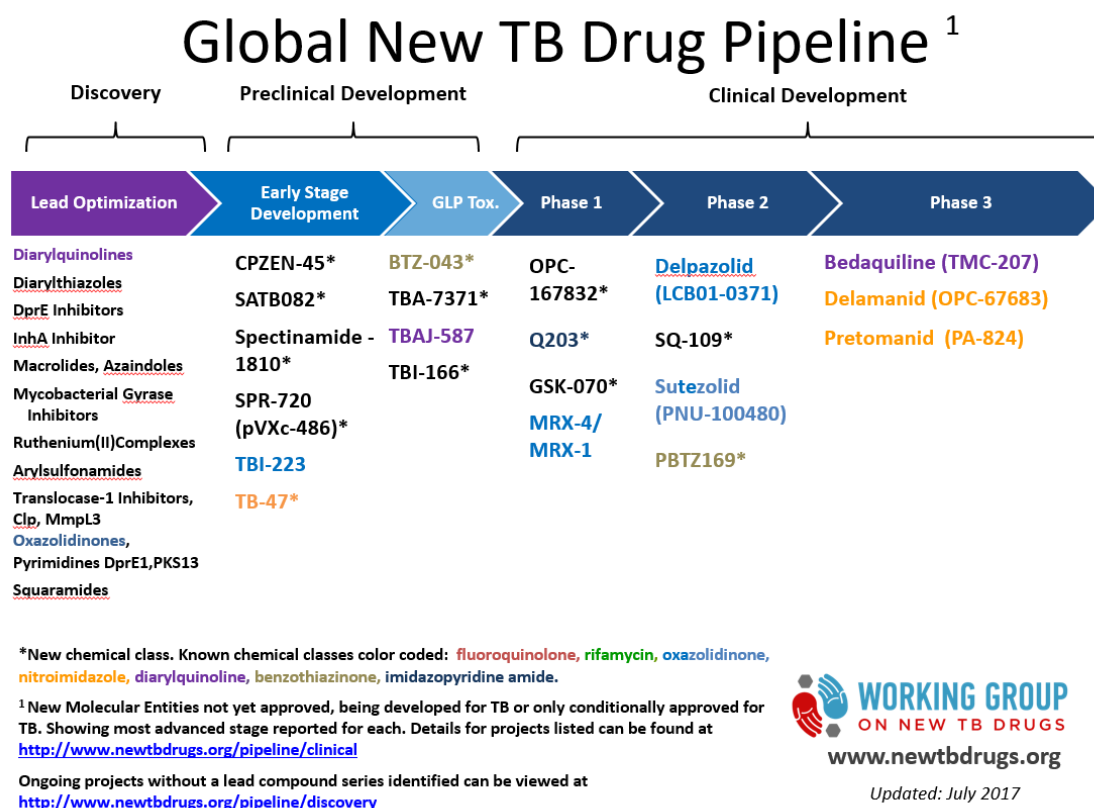
Obrázek 3. Struktura bedaquilinu

kmenům (Obrázek 3).^{9, 10}

Další dvě nové látky ve třetí fázi klinického vývoje patří do skupiny nitroimidazolů (Obrázek 5). Přestože je nitroskupina spojována s rizikem vyšší toxicity, především pak genotoxicity, ve vývoji antituberkulotik se v posledních letech setkáváme s několika velmi

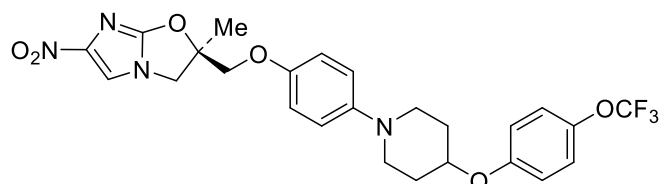
antituberkulotik. O nich se však v této práci nebudu detailněji zmiňovat. Ve třetí fázi klinického vývoje je stále bedaquilin, který byl v roce 2012 schválen americkou FDA pro léčbu MDR TB jako doplněk k současným léčivům druhé linie. Bedaquilin má unikátní mechanismus účinku spočívající v selektivní inhibici mykobakteriální ATP synthasy, což dodává bedaquilinu vysokou baktericidní účinnost proti citlivým i multilékově resistantním

nadějnými kandidáty ze skupiny nitrosloučenin, z nichž delamanid již byl v roce 2014 v Evropě schválen pro léčbu MDR forem TB.^{11, 12}

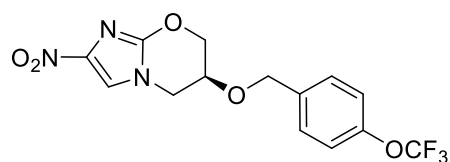


Obrázek 4. Přehled vyvíjených antituberkulotik a fází preklinického a klinického vývoje, ve kterých se nacházejí. Převzato z Working group on new TB drugs⁸

Druhým klinickým kandidátem z této skupiny je pretomanid.¹³⁻¹⁵ Obě tyto látky mají vysokou účinnost proti citlivým i lékově rezistentním formám TB a jsou účinné i proti latentní TB. Mechanismus jejich účinku ještě není zcela objasněn. Bylo zjištěno, že tyto látky jsou redukovány mykobakteriální deazaflavin-dependentní nitroreduktázou na des-nitro deriváty. Meziprodukty při tomto ději jsou pravděpodobně zodpovědné za jejich vysokou antimykobakteriální účinnost. Kromě toho dochází k uvolnění reaktivních forem dusíku, které rovněž přispívají k antimykobakteriálnímu účinku. Delamanid inhibuje syntézu methoxymykolové a ketomykolové kyseliny.¹⁶ Za účinkem pretomanidu v aerobním prostředí stojí rovněž inhibice biosyntézy mykolových kyselin, v anaerobním potom inhibice dýchacího řetězce uvolněním oxidu dusnatého.¹⁴



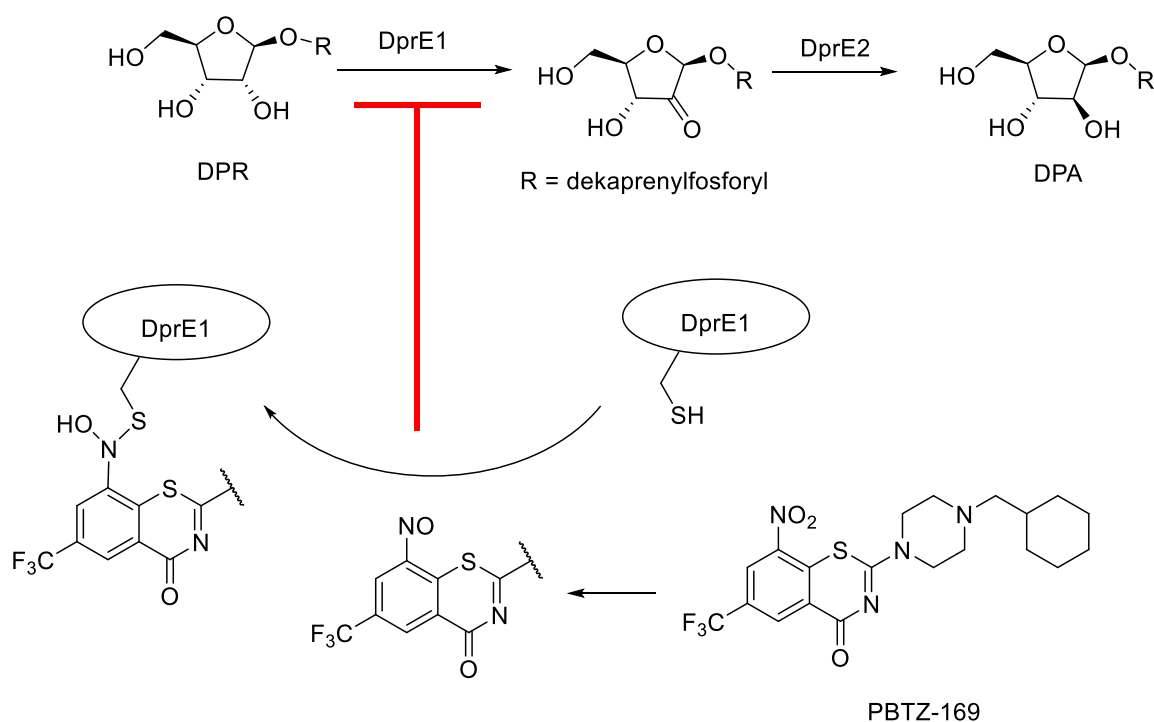
Delamanid (OPC-67683)



Pretomanid (PA-824)

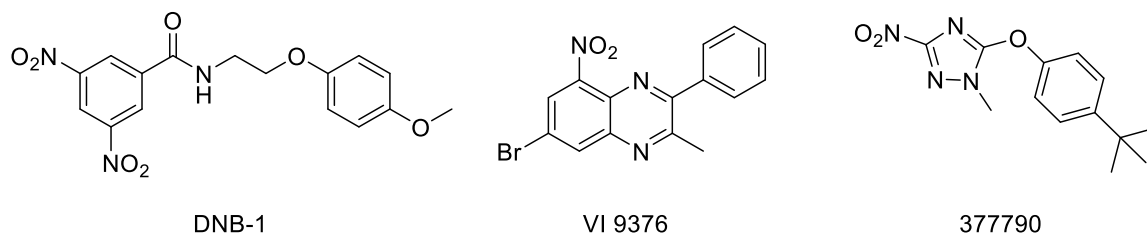
Obrázek 5. Struktura nitroimidazolových antituberkulotik delamanidu a pretomanidu.

Další významnou skupinou vyvíjených antituberkulotik s nitroskupinou jsou benzothiazinony, ve 2. fázi klinického vývoje reprezentovaní látkou PBTZ-169.¹⁷⁻¹⁹ Stejně jako u nitroimidazolů je účinnost benzothiazinonů závislá na přítomnosti nitroskupiny. Ta se v mykobakterii aktivuje redukcí na nitroso derivát, který se váže na cysteinový zbytek v dekaprenylfosforyl- β -D-ribóza-2'-oxidáze (DprE1), čímž dochází k inhibici její funkce (Obrázek 6).²⁰ DprE1 je esenciální enzym epimerující ribózu na arabinózu, která je klíčovým komponentem arabinogalaktanu v mykobakteriální buněčné stěně. Benzothiazinony jsou vysoce účinné na dělicí se mykobakterie a jejich minimální inhibiční koncentrace se pohybuje v řádu nanomolů na litr.¹⁷



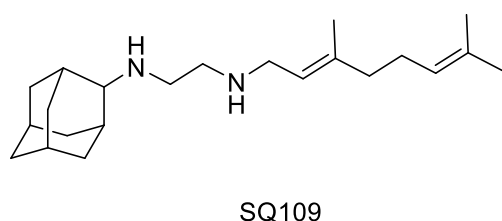
Obrázek 6. Epimerace dekaprenylfosforyl- β -D-ribofuranózy (DPR) na dekaprenylfosforyl- β -D-arabinofuranózu (DPA) pomocí enzymu DprE1 a jeho inhibice benzothiazinonem PBTZ-169.

Mezi další účinné inhibitory DprE1 patří dinitrobenzamidy (DNB-1),²¹ nitrosubstituované chinoxaliny (VI 9376)²² či triazoly (377790, Obrázek 7).²³



Obrázek 7. Inhibitory mykobakteriální DprE1 ze skupiny dinitrobenzamidů (DNB-1), nitrochinoxalinů (VI 9376) a nitrotriazolů (377790).

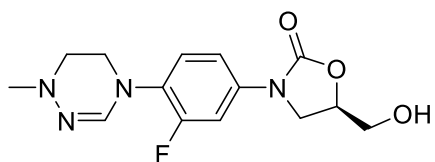
Významným cílem zásahu v současnosti vyvíjených antituberkulotik je transmembránový transportér Mmp13 zodpovědný za přenos mykolových kyselin ve formě trehalózomonomykolátu z cytoplasmy do prostoru buněčné stěny.²⁴ Inhibicí tohoto enzymu dojde k efektivní inhibici syntézy mykobakteriální buněčné stěny. Nejvýznamnějším představitelem skupiny inhibitorů Mmp13 je ethylendiaminový derivát SQ109, který



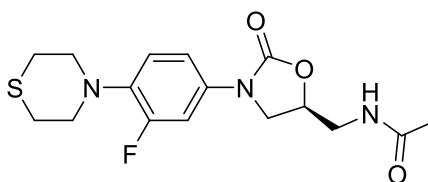
Obrázek 8. Struktura antituberkulotika SQ109

vykazuje excelentní aktivitu proti citlivým i MDR a XDR formám TB a jeho účinek se potencuje s účinkem INH, RIF či bedaquilinu. SQ109 je v současnosti ve 2. fázi klinického vývoje (Obrázek 8).²⁵

Několik potenciálních antituberkulotik v různých fázích klinického vývoje patří mezi oxazolidinony, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici proteosyntézy vazbou na 23S podjednotku rRNA. Ve druhé fázi klinického vývoje se nachází sutezolid²⁶ a delpazolid (Obrázek 9).²⁷ Linezolid potom najdeme v několika vyvíjených kombinačních terapiích.²⁸



Delpazolid



Sutezolid

Obrázek 9. Struktury oxazolidinonových antituberkulotik delpazolidu a sutezolidu

2. KOMENTÁŘ K PŘEDLOŽENÝM PRACÍM

Výsledky shrnuté v předložené habilitační práci vznikly v rozmezí let 2006 až 2017 během mého doktorského studia (2006-2010) a následně během mé práce na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, a to v rámci řešení grantů GAČR 14-08423S, GAUK č. 361215 a GAUK č. 55610/2010, výzkumného záměru MSM 0021620822, projektů Podpora pre-seed aktivit UK mimo Prahu I, reg. n. CZ.1.05/3.1.00/13.0284 a Podpora pre-seed aktivit UK mimo Prahu II, reg. n. CZ.1.05/3.1.00/14.0299 a celofakultního výzkumného projektu „Vývoj a studium léčiv“ (PRVOUK P40).

Během svého doktorského studia jsem se věnoval přípravě a funkcionalizaci dusíkatých heterocyklů, především tetrazolů. U připravených sloučenin byla stanovována účinnost proti bakteriálním a fungálním kmenům a proti vybraným kmenům mykobakterií, avšak bez významnějšího úspěchu. Až v roce 2011 se nám podařilo nalézt sloučeniny na bázi tetrazolu s vysokou a selektivní antituberkulotickou účinností srovnatelnou s antituberkulotikem první linie isoniazidem. Záhy bylo zřejmé, že za touto účinností stojí kombinace právě dusíkatého heterocyklu a dinitrobenzylového substituentu. Od této chvíle se náš výzkum zaměřil na studium vztahů mezi strukturou a účinkem těchto látek a na přípravu nových analogů s vystupňovaným antituberkulotickým účinkem a vyšší selektivitou vůči mykobakteriím. Metodika přípravy a funkcionalizace dusíkatých heterocyklů se pak stala nedílnou součástí těchto strukturně-aktivitních studií.

V následujících letech jsme připravili několik sérií účinných analogů původních látek a zčásti objasnili vztahy mezi jejich strukturou a antimykobakteriální účinností. Získané výsledky prezentované na domácích i zahraničních konferencích vedly k navázání spolupráce s doc. Katarínou Mikušovou z Univerzity Komenského v Bratislavě a s prof. Stewartem T. Colem z EPFL v Lausanne, kteří mimo jiné stojí za vývojem benzothiazinonových antituberkulotik (nyní ve 2. fázi klinického vývoje), v jejichž laboratořích byly a jsou naše látky dále studovány. Díky prof. A. Hrabálkovi pak byla navázána spolupráce s Centrem biologické ochrany AČR v Těchoníně, kde jsou vybrané látky studovány *in vivo* na myším modelu tuberkulózy.

Vzhledem k nadějným vlastnostem látek připravovaných v naší skupině od roku 2011 byly připravené série látek nejprve patentovány a až poté bylo přistoupeno k jejich

zveřejnění formou odborných publikací. I z tohoto důvodu je poměrně výrazná časová prodleva mezi objevem prvních látek (2011) a první odbornou publikací na toto téma (2014).

Z výše uvedených důvodů jsem rozdělil komentář k předloženým pracím do dvou tematických celků, které se však logicky vzájemně prolínají:

- 1. Syntéza a funkcionalizace dusíkatých heterocyklů**
- 2. Studium vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální účinností u nitro-substituovaných *N*-heterocyklických sloučenin**

Publikované práce, patenty a patentové přihlášky budou v následujícím textu citovány jako **P1 – P21**, aby je bylo možno snadno odlišit od prací jiných autorů.

2.1. Syntéza a funkcionalizace dusíkatých heterocyklů

2.1.1. Syntéza a funkcionalizace 5-substituovaných tetrazolů

Tetrazol je syntetický dusíkatý heterocykl s nejvyšším obsahem dusíku mezi stabilními heterocykly ($w(\text{N}) = 80\%$). Uvažujeme-li o monosubstituovaných tetrazolech, je možné rozlišit 3 isomery: 1-substituované *1H*-tetrazoly, 2-substituované *2H*-tetrazoly a konečně 5-substituované tetrazoly. Zvláštní postavení ve farmaceutické chemii zaujímají především třetí jmenovaní, 5-substituované tetrazoly (Schéma 1). Ty jsou využívány jako neklasické bioisostery karboxylových kyselin, a to díky velmi blízkým hodnotám pK_a 5-substituovaného tetrazolu a odpovídající karboxylové kyseliny. Klasickým příkladem využití 5-substituovaného tetrazolu jakožto bioisosteru karboxylové kyseliny je léčivo losartan.²⁹ Nejběžnějším postupem přípravy 5-substituovaného tetrazolu je kysele katalyzovaná adice azidové skupiny na nitril. V literatuře je popsána celá řada metod využívajících především *in situ* generovaných azidů amonných,³⁰ Lewisových kyselin³¹ či organokovových³² a organokřemičitých³³ azidů (o metodách přípravy 5-substituovaných tetrazolů pojednává přehledový článek [P13]).

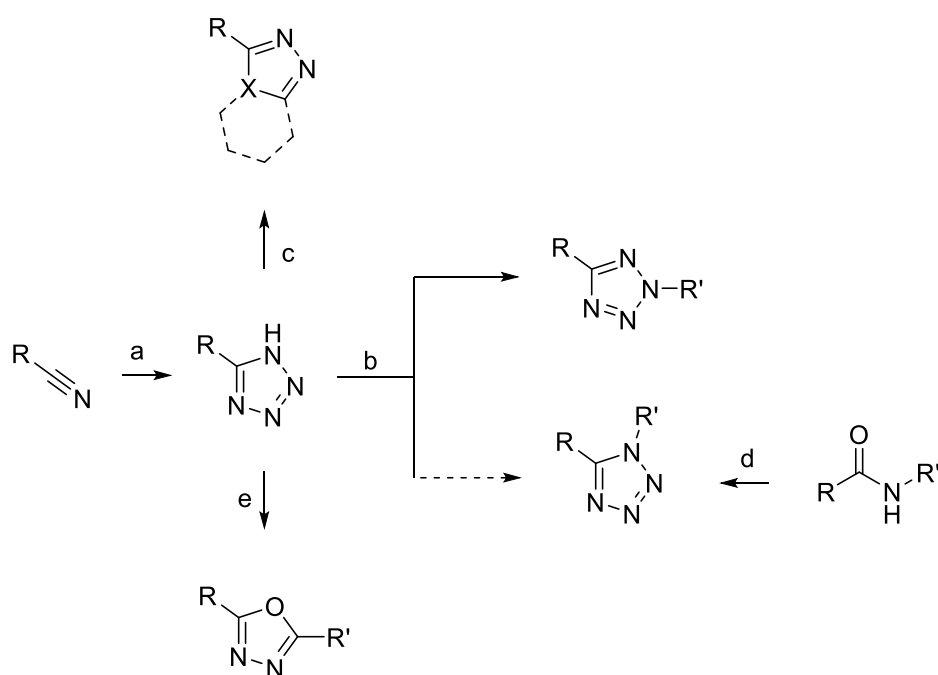


Schéma 1. Obecné schéma přípravy a funkcionalizací 5-substituovaných tetrazolů využívaných v publikovaných pracích. Symboly nad šipkami odkazují na příložené práce: (a) [P1, P2, P4, P11, P12, P18, P19, P20]; (b) [P3, P11, P12, P18, P19, P20]; (c) [P4]; (d) [P11]; (e) [P9, P15, P16]

Limitací většiny v té době známých metod byly dlouhé reakční časy a vysoká reakční teplota. Z tohoto důvodu jsme využili mikrovlnnou iradiaci a její pomocí urychlili a zefektivnili známou metodu dle Sharplesse,³¹ využívající reakci nitrilu s azidem sodným v přítomnosti zinečnatých solí (Schéma 2) [P1].

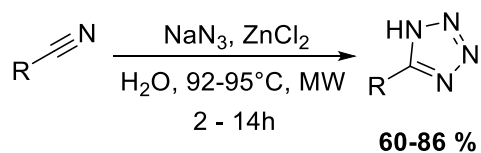


Schéma 2. Příprava 5-substituovaných tetrazolů metodou dle Sharplesse³¹ s využitím mikrovlnné iradiace [P1].

Praktická využitelnost této metody však stále nebyla dostatečná, proto jsme posléze vyvinuli metodu využívající polární aromatická rozpouštědla a mikrovlnnou iradiaci, která jednak výrazně zkrátila reakční časy, umožnila přípravu tetrazolů z velmi málo reaktivních a stericky bráněných nitrilů a navíc umožnila snadnou extrakci produktu do vody či vodného roztoku báze (Schéma 3) [P2]. Různé modifikace těchto postupů syntézy 5-substituovaných tetrazolů pak byly použity v přípravě antimykobakteriálně účinných derivátů tetrazolu [P11, P12, P18, P19, P20].

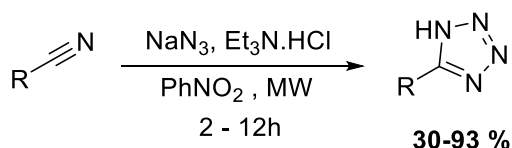


Schéma 3. Příprava 5-substituovaných tetrazolů v polárních aromatických rozpouštědlech s využitím mikrovlnné iradiace [P2].

5-Substituované tetrazoly se vyskytují ve dvou tautomerních formách, 1*H*- a 2*H*-, jejich alkylace tedy vedou ke vzniku 2 regioisomerů, 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů (o metodách funkcionalizace 5-substituovaných tetrazolů pojednává přehledový článek [P13]) (Schéma 1). Klíčovou roli při těchto reakcích hraje sterická náročnost substituentu R v poloze 5 tetrazolu a zbytku alkylačního činidla R'. Obvykle vedou alkylace 5-substituovaných tetrazolů k zisku směsi obou regioisomerů, které bylo ve většině námi provedených reakcí možné chromatograficky oddělit. Při studiu těchto alkylačních reakcí jsme zjistili, že reakce 5-substituovaných tetrazolů s 1,2-dibromethanem a triethylaminem vedou selektivně ke vzniku 5-substituovaného 2-vinyl-2*H*-tetrazolu. Vysoká selektivita je pravděpodobně způsobena sterickými efekty *in situ* vznikajícího alkylačního činidla (2-

bromethyl)triethylamonium-bromidu a velikostí substituentu R na tetrazolu. Po navázání (2-bromethyl)triethylamonium-bromidu na tetrazol pak dochází ke spontánní eliminaci triethylamonium-bromidu za vzniku 2-vinyl tetrazolu. U reakcí s objemnějšími arylovými substituenty R byl výtěžek 5-substituovaného 2-vinyl-2*H*-tetrazolu vyšší než u reakcí s alkylovými substituenty R (Schéma 4) [P3].

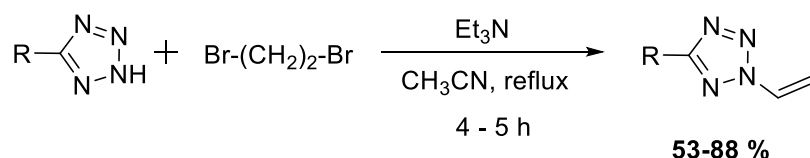


Schéma 4. Regioselektivní vinylace 5-substituovaných tetrazolů [P3].

Alkylace 5-substituovaných tetrazolů byla hojně využívána k přípravě antimykobakteriálně účinných látek. V případně alkylace stericky náročnějších 5-aryl-1*H*-tetrazolů byl jako majoritní produkt izolován vždy 2,5-disubstituovaný tetrazol [P11, P12, P18, P19, P20]. V případě potřeby přípravy 1,5-disubstituovaného tetrazolu bylo nutné zvolit jiné cesty. Přestože jsou popsány jednoduché,³⁴ často jednokrokové metody jejich přípravy,³⁵ v našem případě se nejvíce osvědčila příprava z amidu karboxylové kyseliny cestou přes thioamid a následnou reakcí s trimethylsilylazidem v přítomnosti rtuťnaté soli [P11].³⁶

5-Substituované tetrazoly je možné s výhodou využít jako výchozí látky pro přípravu jiných heterocyklů. Navázáním elektronakceptorového substituentu na tetrazol může dojít k eliminaci molekuly dusíku a k přesmyku za vzniku *ortho*-kondenzovaného heterocyklu.³⁷ Toho jsme využili při přípravě nesymetrických prekurzorů pro přípravu azaftalocyaninů [P4]. V našem případě jsme využili reakci 5-substituovaných tetrazolů s 5-chlor-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem. Při vzniku 2,5-disubstituovaného tetrazolu došlo k výše zmíněnému přesmyku a vzniku [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazinového jádra. Objemnost substituentu R opět hrála klíčovou roli při regioselektivitě reakce. U objemných substituentů vznikal téměř výhradně kýžený *ortho*-kondenzovaný produkt. Při reakcích s menším substituentem R došlo i ke vzniku vedlejšího produktu, 1,5-disubstituovaného tetrazolu (Schéma 5).

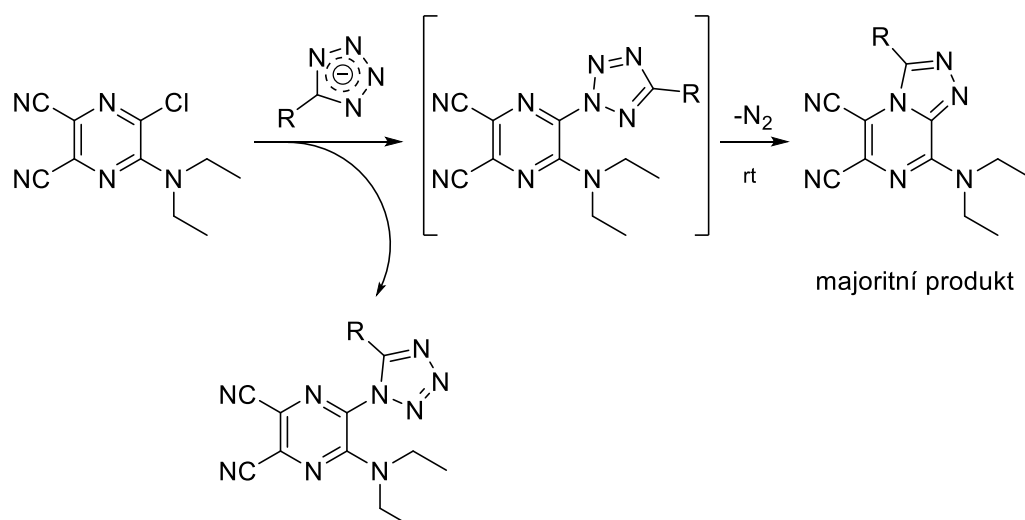


Schéma 5. Příprava [1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazinových derivátů s využitím 5-substituovaných tetrazolů [P4].

Obdobným mechanismem pak probíhá acylace 5-substituovaných tetrazolů. Po navázání acylu do polohy 2 tetrazolu dochází k přesmyku za vzniku 2,5-disubstituovaných-1,3,4-oxadiazolů.³⁸ Tato reakce byla rovněž využita při přípravě antimykobakteriálně účinných látek [P9, P15, P16].

2.1.2. Syntéza a funkcionizace 1-substituovaných-1H-tetrazol-5-thiolů a jejich selenových analogů

Specifickými sloučeninami tetrazolů jsou tetrazol-5-thioly (Schéma 6). Studium těchto sloučenin má na našem pracovišti dlouhou tradici a vybrané tetrazol-5-thioly byly studovány jako antituberkulotika³⁹⁻⁴¹ či thyreostatika.⁴²

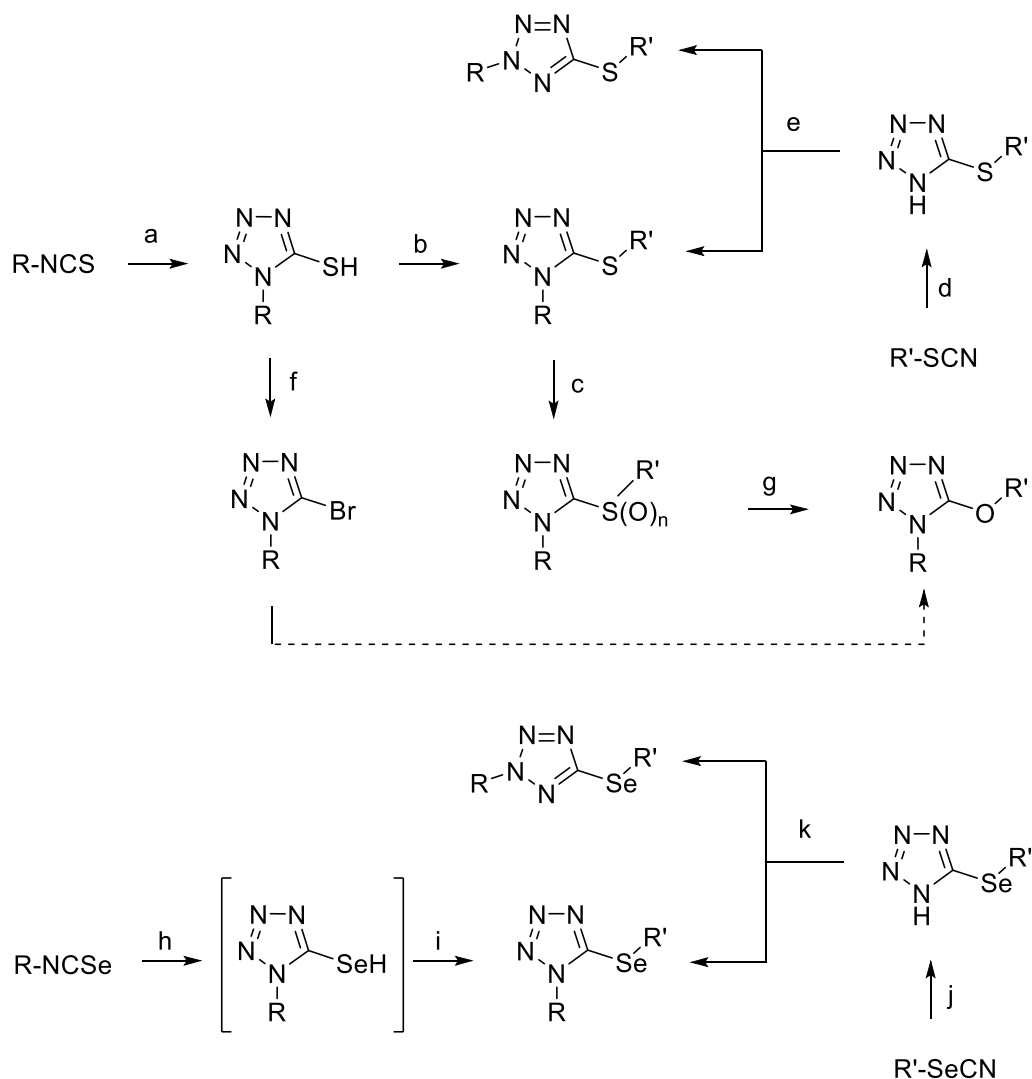


Schéma 6. Obecné schéma přípravy a funkcionizací 1-substituovaných-1H-tetrazol-5-thiolů a jejich analogů využívaných v publikovaných pracích. Symboly nad šipkami odkazují na příložené práce: (a) [P6, P7, P10, P14, P21]; (b) [P7, P10, P11, P14, P21]; (c) [P7, P14]; (d) [P7, P8, P9]; (e) [P8]; (f) [P6]; (g) [P7, P14]; (h), (i) [P5, P7]; (j), (k) [P8].

Velmi jednoduchou a zároveň efektivní metodou přípravy 1-substituovaných tetrazol-5-thiolů je reakce odpovídajících isothiokyanátů s azidem sodným ve vodě za zvýšené teploty.⁴³ Tato metoda byla použita pro přípravu rozsáhlé série tetrazol-5-thiolů

[P6, P7, P10, P14, P21]. Alkylace v bazickém prostředí pak vede k získání 1-substituovaných 5-alkylsulfanyl-1*H*-tetrazolů ve vysokých výtěžcích [P7, P10, P14, P21].⁴⁴ Tyto látky podléhají ochotně oxidaci peroxidem vodíku v kyselině octové za vzniku sulfoxidů a sulfonů. Při nižší reakční teplotě (45 °C) lze získat přednostně sulfoxidy, při vyšší teplotě (70 °C) pak sulfony [P7]. Obě oxidované formy jsou významnými výchozími látkami pro přípravu 5-alkoxytetrazolů, přičemž dochází k odstoupení alkansulfenátu, resp. alkansulfínátu [P7, P14].⁴⁵ K přípravě těchto látek lze rovněž využít 1-substituované 5-halo-1*H*-tetrazoly. V rámci spolupráce s doc. L. V. Myznikovem se nám podařilo vyvinout jednoduchou jedнокrokovou syntézu 5-brom-1*H*-tetrazolů ze snadno dostupných tetrazol-5-thiolů (Schéma 7) [P6].

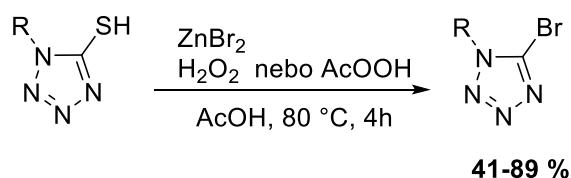


Schéma 7. Jednokroková příprava 1-substituovaných 5-brom-1*H*-tetrazolů z tetrazol-5-thiolů [P6].

V rámci řešení grantu GAUK č. 55610/2010 (Syntéza a vlastnosti selenových analogů sirných antituberkulotik) jsme detailně popsali možnost přípravy selenových analogů tetrazol-5-thiolů a jejich derivátů. Zjistili jsme, že tetrazol-5-selenoly jsou nestabilní a bylo nutné je *in situ* alkylovat za vzniku 1-substituovaných 5-alkylselanyl-1*H*-tetrazolů. Nicméně i v případě *in situ* alkylace 5-aryl-1*H*-tetrazol-5-selenolů nedocházelo ke vzniku pouze kýžených produktů, ale navíc i ke vzniku *N*-alkyl-*N*-arylkyanamidů a (*Z*)-*Se*-alkyl-*N*-kyan-*N,N'*-diarylisoselenomočovin (Schéma 8) [P5, P7].

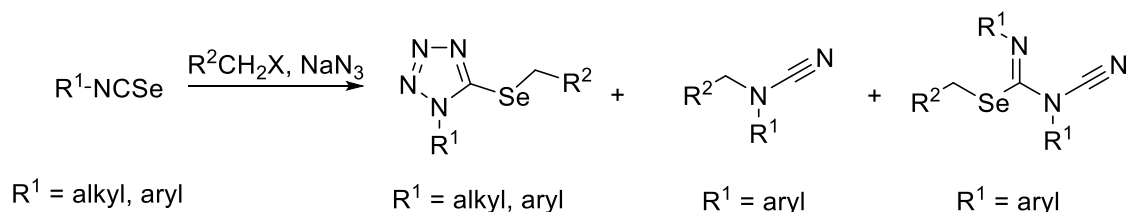


Schéma 8. Příprava 1-substituovaných 5-alkylselanyl-1*H*-tetrazolů z isoselenokyanátů [P5].

1-Substituované 5-alkylselanyl-1*H*-tetrazoly lze připravit i alkyací 5-alkylselanyl-1*H*-tetrazolů v bazickém prostředí. Tato reakce vede stejně jako v případě popsaném

v kapitole 2.1.1 ke vzniku dvou regioisomerů, 1,5- a 2,5-disubstituovaných tetrazolů. Stejně je to u sirných analogů, tedy při alkylyci 5-alkylsulfanyl-1*H*-tetrazolů v bazickém prostředí. Díky menšímu sterickému bránění pozice 1 tetrazolu vznikaly při těchto reakcích oba regioisomery v poměrech 1 : 1 až 1 : 4 ve prospěch 2,5-regioisomeru. Ze získaných NMR spekter vyplynul základní rozpoznávací znak obou regioisomerů, a to posun signálu tetrazolového uhlíku i signálů methylenové skupiny vázané na dusík tetrazolu do nižšího pole u 2,5-disubstituovaného tetrazolu než u 1,5-disubstituovaného tetrazolu [P8]. Tento obecný poznatek byl potvrzen i v dalších pracích, a to u 1- a 2-substituovaných 5-aryltetrazolů [P11].

2.1.3. Syntéza a funkcionalizace 5-substituovaných 1,3,4-oxadiazol-2-thiolů a 1,3,4-thiadiazol-2-thiolů

Po objevení vysoce antituberkuloticky účinných sloučenin na bázi tetrazol-5-thiolů se naše pozornost zaměřila na isosterní 1,3,4-oxadiazol-2-thioly a 1,3,4-thiadiazol-2-thioly a jejich alkylované sloučeniny (Schéma 9).

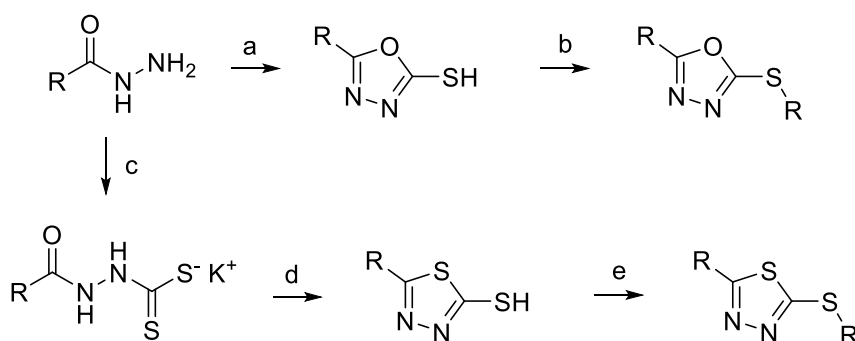


Schéma 9. Obecné schéma přípravy a alkylace 5-substituovaných 1,3,4-oxadiazol-2-thiolů a 1,3,4-thiadiazol-2-thiolů využívaných v publikovaných pracích. Symboly nad šipkami odkazují na příložené práce: (a) [P9, P10, P12, P15, P16, P17]; (b) [P9, P10, P12, P15, P16, P17]; (c) [P9, P15, P16]; (d) [P9, P15, P16]; (e) [P9, P15, P16].

K syntéze oxa- i thiadiazol-2-thiolů byly použity hydrazidy karboxylových kyselin a sirouhlík v bazickém prostředí. Zahříváním těchto reaktantů ve vhodném rozpouštědle (především ethanol a/nebo voda) byly připraveny 1,3,4-oxadiazol-2-thioly [P9, P10, P12].⁴⁶ Při přípravě thiadiazol-2-thiolů bylo nejprve nutno izolovat za laboratorní teploty vznikající draselnou sůl dithiokarbazátu, která byla cyklizována na cílový thiadiazol-2-thiol v koncentrované kyselině sírové [P9].⁴⁷ Přestože příprava thiadiazol-2-thiolů poskytovala často nízké výtěžky a postup přípravy a zpracování reakční směsi nebyly zdaleka optimální,

nepodařilo se nám vyvinout jednodušší metodu přípravy. I z tohoto důvodu jsme se ve většině prací věnovali studiu 2-substituovaných 5-alkylsulfanyl-1,3,4-oxadiazolových derivátů [P9, P10, P12, P15, P16, P17] namísto thiadiazolových [P9, P15, P16].

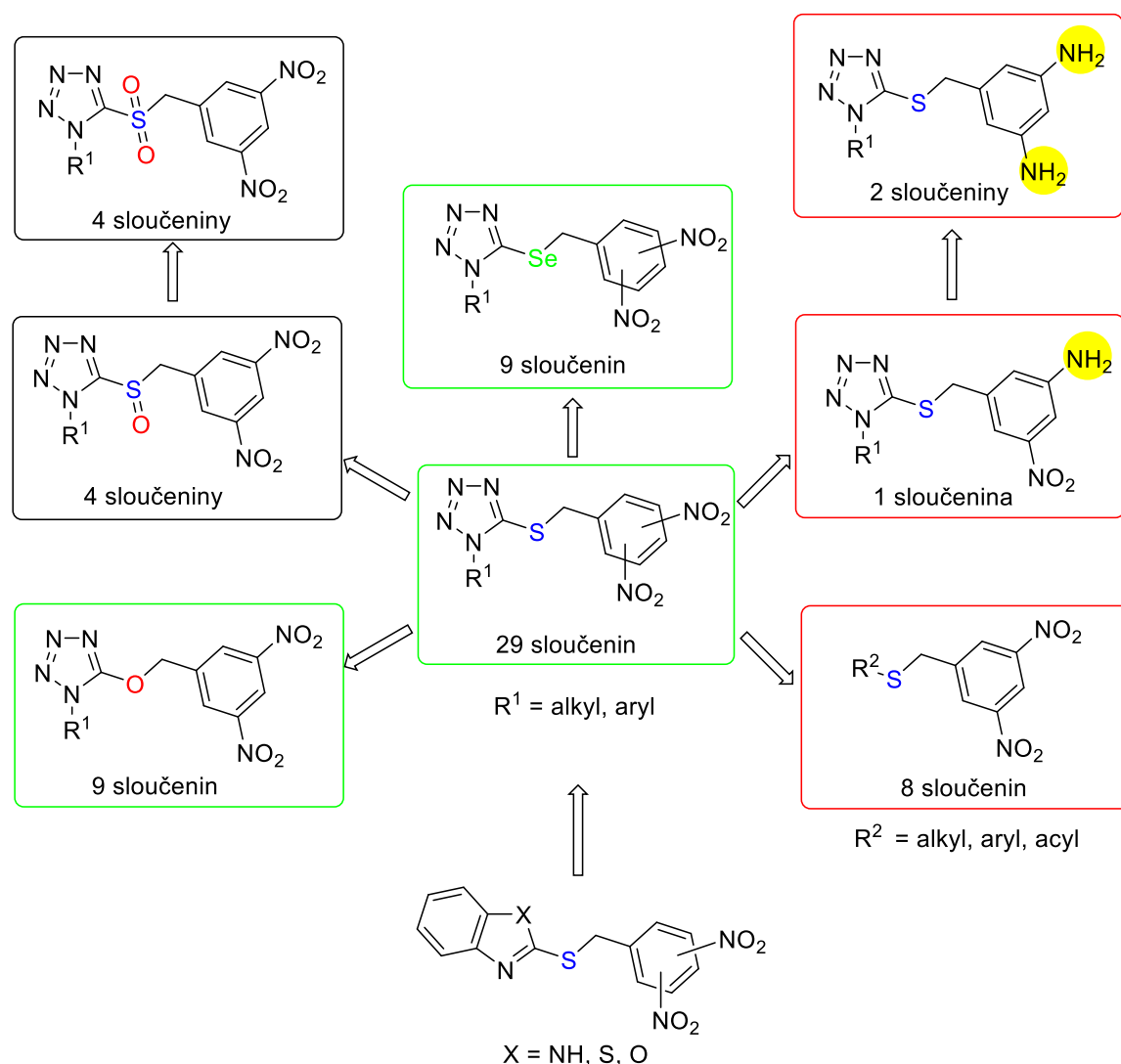
2.2. Studium vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální účinností u nitro-substituovaných *N*-heterocyklických sloučenin

2.2.1. Antimykobakteriálně účinné dinitrobenzylsulfanyl-substituované heteroaromatické sloučeniny

V roce 2011 jsme připravili první z později rozsáhlé série antimykobakteriálně účinných látek ze skupiny dinitrobenzylsulfanyl-substituovaných heterocyklů. Při syntéze těchto látek jsme se inspirovali v pracích doc. V. Klimešové, ve kterých bylo zjištěno, že 2-(dinitrobenzylsulfanyl)benzazoly vykazují vysokou *in vitro* antimykobakteriální aktivitu blížící se účinnosti isoniazidu, zatímco jinak substituované 2-(benzylsulfanyl)benzazoly jsou antimykobakteriálně neúčinné.^{48, 49}

Rozhodli jsme se nahradit rigidní a obtížně funkcionalizovatelný benzazol-2-thiolový fragment za různě substituovanou tetrazol-5-thiolovou skupinu (Schéma 10). Rozsáhlá strukturně-aktivitní studie podkryla roli jednotlivých fragmentů molekuly v antimykobakteriální aktivitě [P7]. Nejvyšší účinnost vykazaly 1-substituované 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-1*H*-tetrazoly. Jejich minimální inhibiční koncentrace (MIC) dosáhla hodnot 1 μM proti sbírkovému kmeni *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 a až 0,25 μM proti klinicky izolovaným MDR kmenům. Pro srovnání, MIC standardních antituberkulotik INH a RIF proti sbírkovému kmeni *M. tuberculosis* My 331/88 je 0,5, resp. 0,25 μM . 2,4-Dinitrobenzylové analogy, které ve skupině benzazolů vykazovaly srovnatelnou účinnost s 3,5-dinitro isomery, byly v sérii tetrazolových sloučenin signifikantně méně účinné. Atom síry v methylsulfanylovém spojovacím řetězci se v tomto případě ukázal býti zaměnitelným, jelikož selenové i kyslíkaté isostery vykazaly prakticky shodnou účinnost, zatímco oxidace síry na sulfoxid či sulfon vedla ke snížení účinnosti. Substituent R^1 na tetrazolu ovlivnil antimykobakteriální účinnost především svou lipofilitou. Méně lipofilní deriváty byly méně účinné, v případě ionizovatelné karboxylové skupiny či kyselého 1*H*-tetrazolu pak došlo k úplné ztrátě účinku. Klíčová role přítomnosti dvou nitroskupin byla prokázána antimykobakteriálně neúčinnými parciálně a plně redukovanými analogy a mononitroderiváty. Role tetrazolového cyklu, obecněji přítomnosti heterocyklu, byla prokázána přípravou alkylovaného, arylovaného, či acetylovaného (3,5-dinitrofenyl)methanthiolu, kdy došlo ke snížení až ztrátě antimykobakteriálního účinku. U nejúčinnějších 1-substituovaných 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-1*H*-tetrazolů byla zjištěna vysoká selektivita antimykobakteriálního účinku, jelikož tyto látky nebyly účinné proti

grampozitivním a gramnegativním bakteriím či fungálním kmenům a navíc neovlivňovaly viabilitu lidských buněčných liniích v koncentracích do 30 μM . Proto se tyto látky staly předmětem národního patentu a vůdčími strukturami pro přípravu a studium jejich analogů [P7, P14].



MIC: *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 - **1 μM** (12 příkladů)
 (INH - 0,5 μM , RIF - 0,25 μM)
 MDR *M.tuberculosis* (6 kmenů) - **0,25 - 1 μM** (6 příkladů)

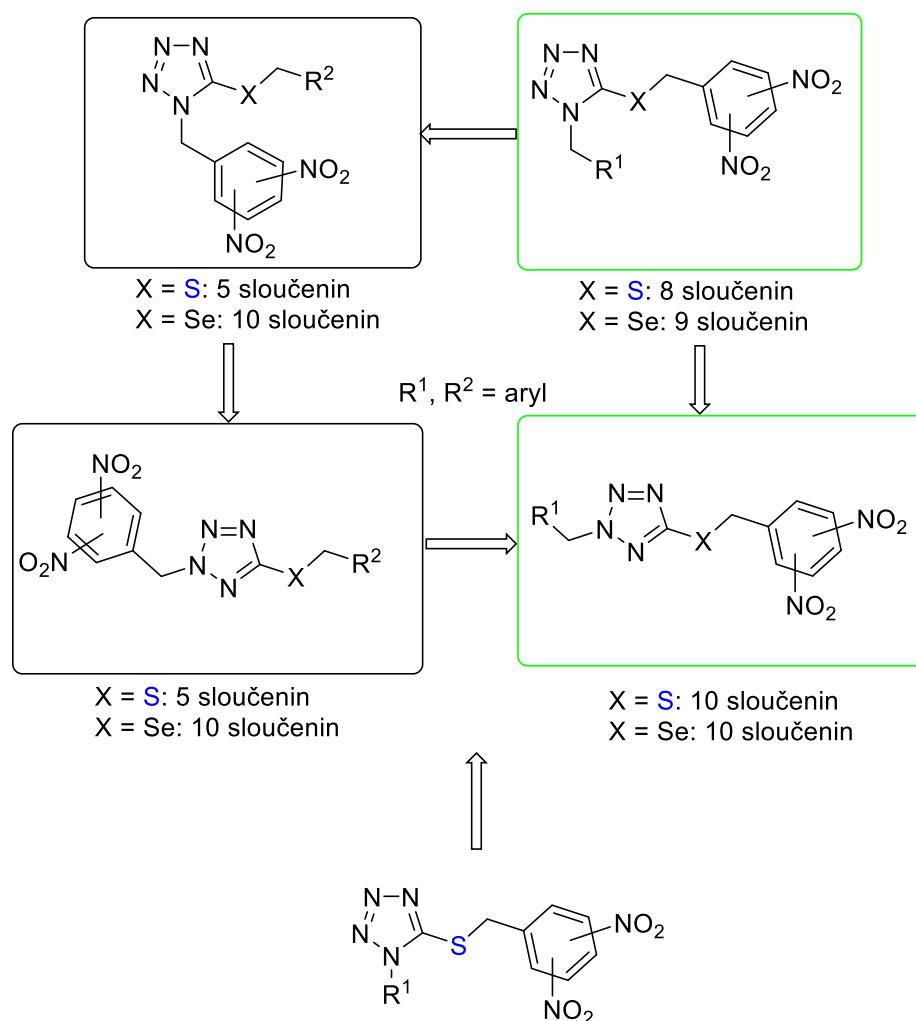
pokles účinku

ztráta účinku

Schéma 10. Obecné schéma látek připravených v první rozsáhlé strukturálně-aktivitní studii dinitrobenzylsulfanyl tetrazolů [P7, P14].

V další studii jsme se zaměřili na vliv tetrazolových regioisomerů a umístění dinitrobenzylového fragmentu v molekule na antimykobakteriální účinnost. Z výsledků studie vyplynulo, že pro antimykobakteriální účinnost je optimální kombinace

3,5-dinitrobenzylové skupiny vázané na atom síry/selenu a umístění druhého substituentu v poloze 2 tetrazolu (Schéma 11). Sloučeniny tohoto strukturního typu vykázaly výbornou antimykobakteriální účinnost proti *M. tuberculosis* srovnatelnou s INH a vysokou selektivitu účinku. Vzhledem k přítomnosti nitroskupin jsme vybrané látky podrobili *in vitro* Amesově testu, tzn. základnímu testu genotoxicity. Námi studované látky nevykázaly genotoxické vlastnosti [P8].



MIC: *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 - **1 μM** (11 příkladů)
(INH - 0,5 μM, RIF - 0,25 μM)

pokles účinku

Schéma 11. Obecné schéma látek připravených ve strukturně-aktivitní studii tetrazolových regioisomerů obsahujících dinitrobenzylovou skupinu [P8].

Z výsledků této studie vyplynulo další směřování designu nových analogů. Vzhledem k vyšší účinnosti 2,5-disubstituovaných tetrazolů jsme uvažovali o analozích s isosterním

uspořádáním centrálního heterocyklu. Z tohoto důvodu jsme jako výchozí látky pro další studie vybrali 5-substituované 1,3,4-oxadiazol-2-thioly a 1,3,4-thiadiazol-2-thioly. Připravené 2-substituované 5-(3,5-dinitrobenzylsulfanyl)-1,3,4-oxadiazoly a 1,3,4-thiadiazoly vykazaly excelentní antimykobakteriální aktivitu, která byla potvrzena experimenty v EPFL v Lausanne s replikujícími se i nereplikujícími se kmeny mykobakterií. Obzvláště silný baktericidní účinek na nereplikující se formy mykobakterií (byl použit kmen *M. tuberculosis* SS18b-lux) byl velkým úspěchem a je vysoce ceněnou vlastností těchto látek [P9].

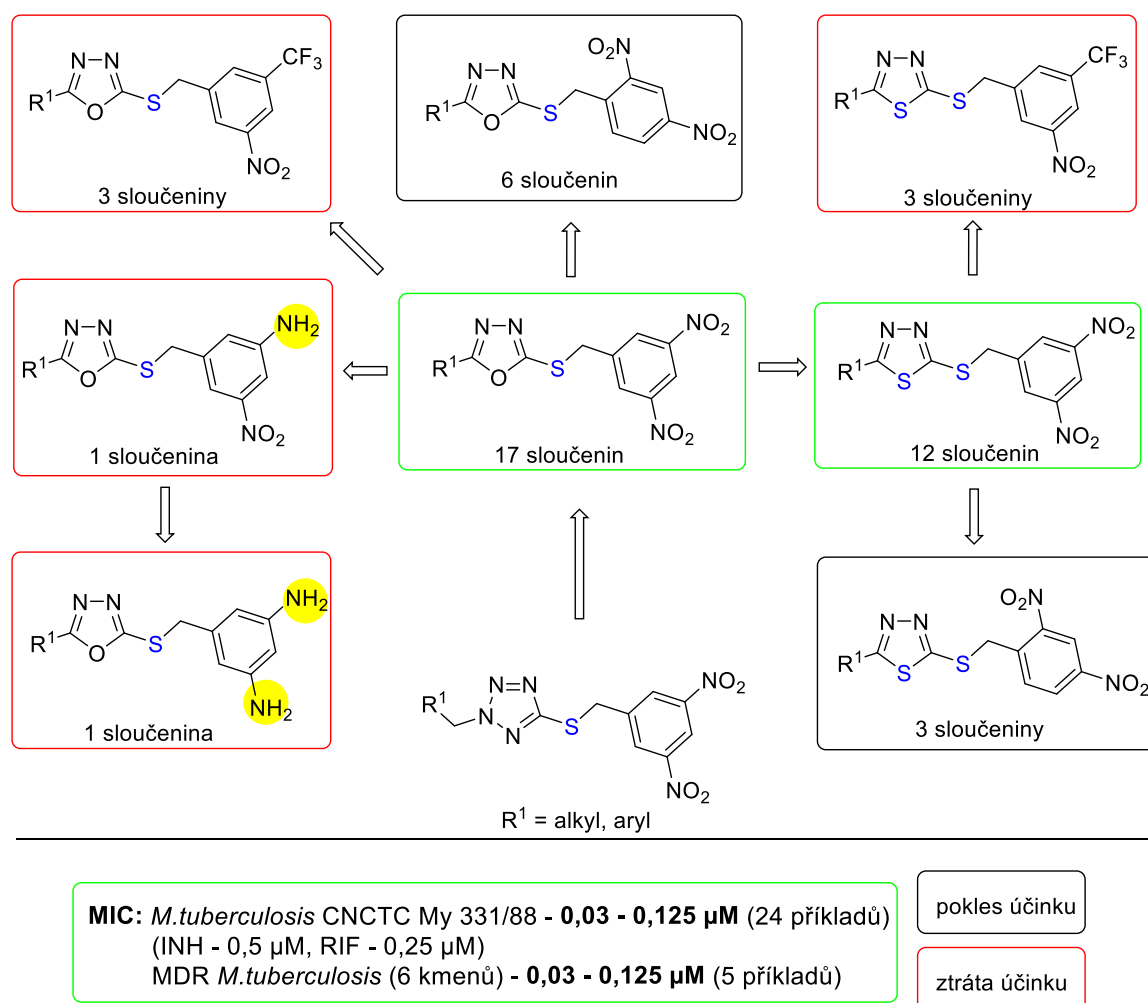


Schéma 12. Obecné schéma látek připravených ve strukturně-aktivitní studii oxadiazolových a thiadiazolových derivátů [P9, P15, P16].

Minimální inhibiční koncentrace proti standardním i MDR kmenům je až 0,03 μM, čímž tyto látky překonávají *in vitro* účinnosti všechna používaná antituberkulotika první linie [P9, P15, P16]. Další studie opět potvrdily vysokou selektivitu účinku – látky nebyly účinné proti grampozitivním ani gramnegativním bakteriím, fungálním kmenům,

neovlivňovaly viabilitu lidských buněčných linií (včetně izolovaných lidských hepatocytů) a v Amesově testu nevykázaly genotoxické vlastnosti. U vybrané látky byla studována genotoxicita i dle OECD předpisů č. 487 a č. 473 (*in vitro* mammalian cell micronucleus test a *in vitro* mammalian chromosome aberration test), opět bez zjištěných genotoxických/mutagenních vlastností [P9].

Ve spolupráci s doc. K. Mikušovou jsme se zaměřili i na mechanismus účinku těchto látek. Hypotéza byla jednoduchá a logická. 3,5-Dinitrofenylovou skupinu obsahují antituberkuloticky vysoce účinné inhibitory DprE1, jako dinitrobenzamidy²¹ či zástupci benzothiazinonů.¹⁷ Provedené dockingové studie naznačily vysokou afinitu těchto látek k DprE1, avšak experimenty s inhibicí DprE1 enzymu *M. smegmatis* a experimenty s inkorporací radioaktivně značeného octanu sodného do mykobakteriálních lipidů silně zpochybnily tuto hypotézu. I z této naší zkušenosti tedy plyne důležitý závěr, a to že bez experimentálního důkazu není možné činit závěry na základě pozitivních výsledků dockingových studií. Závěr, že cílem našich látek není DprE1, byl nepřímo potvrzen přípravou trifluormethylových analogů našich látek. U DprE1 inhibitorů je možno jednu nitroskupinu zaměnit za trifluormethylovou skupinu bez ztráty účinku (nebo dokonce s výrazným zesílením antimykobakteriálního účinku).^{17, 50} Avšak námi připravené trifluormethylové analogy zcela ztratily antimykobakteriální účinnost (Schéma 12) [P9].

Experimenty s radioaktivně značeným uracilem a methioninem ukázaly výrazně sníženou inkorporaci těchto biomolekul do mykobakteriálních nukleových kyselin, resp. proteinů, po podání studovaných látek mykobakteriím. To by mohlo poukazovat na zásah 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazolových a thiadiazolových derivátů do syntézy mykobakteriálních nukleových kyselin [P9]. Studiu mechanismu účinku našich látek se stále věnujeme a zmíním se o něm ještě na závěr v kapitole 3.

Naprosto klíčová role 3,5-dinitrofenylového fragmentu byla potvrzena mnoha provedenými modifikacemi tohoto uskupení, z nichž většina ještě nebyla publikována. Nicméně je možné říci, že jakákoli dosud provedená změna ve struktuře 3,5-dinitrofenylového fragmentu vedla k výraznému snížení či vymizení antimykobakteriální účinnosti látky (Schéma 13).

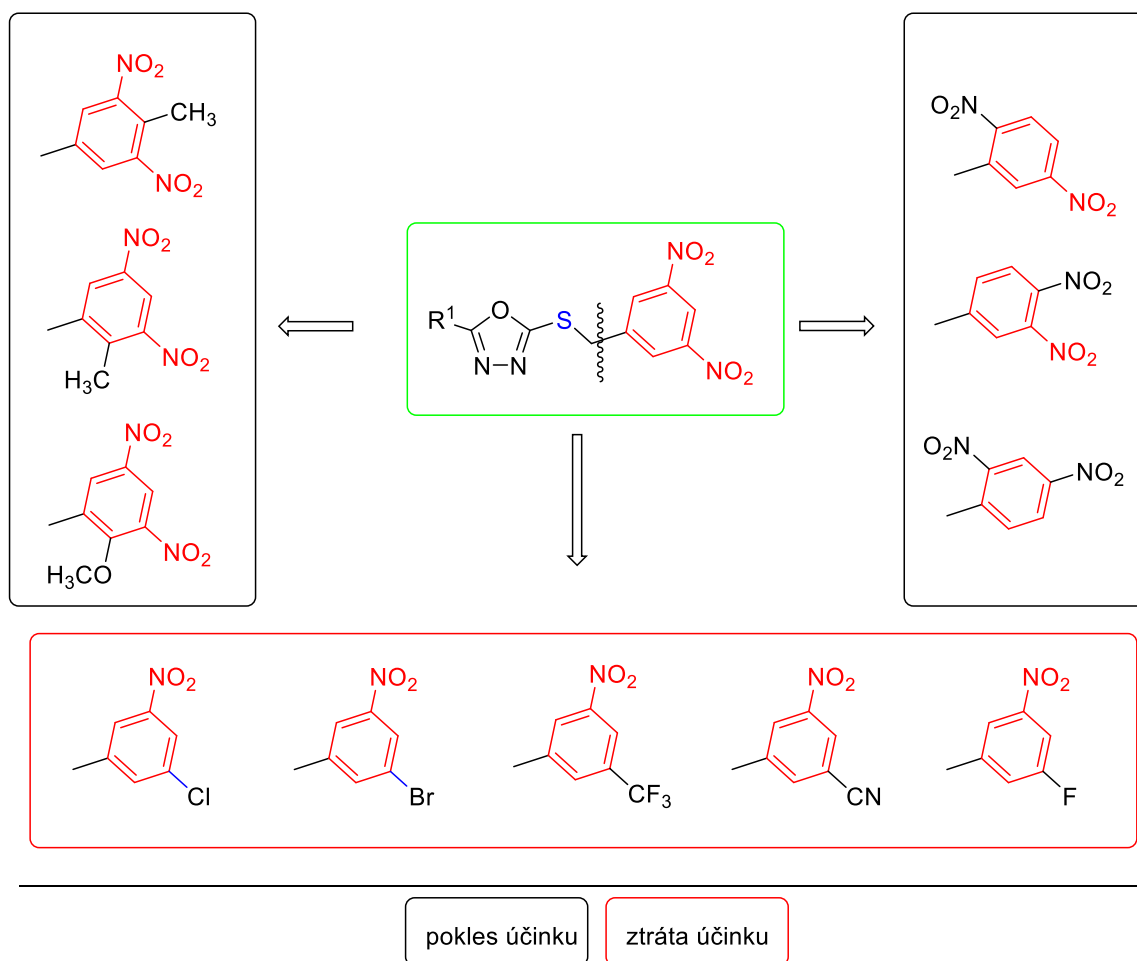
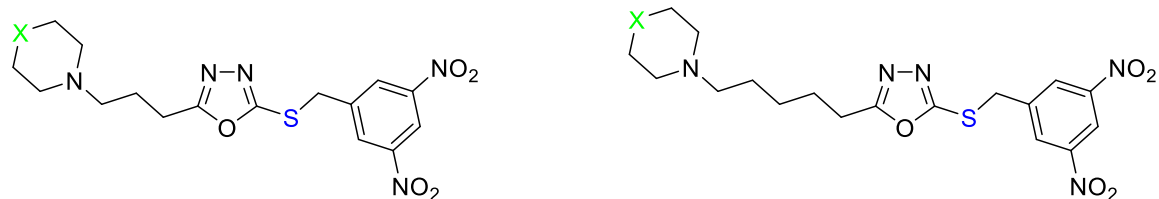


Schéma 13. Strukturně-aktivitní studie zaměřená na 3,5-dinitrofenylový fragment v oxadiazolových derivátech.

Poměrně významným nedostatkem studovaných oxadiazolových i thiadiazolových látek byla jejich velmi nízká rozpustnost ve vodě či vodných médiích. Několik farmakokinetických experimentů potvrdilo jejich prakticky nulovou biodostupnost po perorálním podání. Toto zjištění velmi komplikovalo možné *in vivo* studie antituberkulotické účinnosti, a proto jsme se zaměřili na přípravu derivátů s vyšší rozpustností ve vodě. K tomu jsme využili substituent R^1 , o kterém jsme z předchozích studií věděli, že ovlivňuje antimykobakteriální účinnost prakticky pouze svojí lipofilitou. Proto jsme připravili sérii látek s nasyceným dusíkatým heterocyklem v postranním řetězci R^1 , který by umožnil přípravu ve vodě rozpustných solí a zároveň si v neionizované podobě zachoval dostatečnou lipofilitu (Tabulka 2) [P12].

Tabulka 2. Antimykobakteriální účinnost 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazolů s bazickým dusíkatým heterocyklem v postranním řetězci [P12].



X	CLog P	MIC (μM) (<i>M.tuberculosis</i>)	X	CLog P	MIC (μM) (<i>M.tuberculosis</i>)
NCH ₃	-0,18	>32	NCH ₃	0,88	32
O	0,75	8	O	1,81	8
CH ₂	1,96	16	CH ₂	3,02	16
NBn	3,03	2	NBn	4,09	1
INH		0,5	INH		0,5

Výsledky studie potvrdily roli lipofility postranního řetězce R¹ v antimykobakteriální účinnosti sloučenin. Nejvyšší účinnost vykázaly *N*-benzylpiperazinové deriváty s nejvyšší lipofilitou. Z těchto látek pak byly připraveny ve vodě rozpustné dihydrochloridy, které si zachovaly vysokou antimykobakteriální účinnost a selektivitu, jelikož až do koncentrace 30 μM neovlivňovaly viabilitu lidských buněčných linií [P12].

2.2.2. Antimykobakteriálně účinné dinitrofenyl-substituované heteroaromatické sloučeniny

Jednou z cest designu dalších analogů antimykobakteriálních 3,5-dinitrobenzylsulfanyl tetrazolů a oxadiazolů byla tvorba tzv. reverzních analogů. Spočívala v záměně pozice klíčového 3,5-dinitrofenylového uskupení a substituentu R¹. Byla tedy připravena malá skupina 5-alkylsulfanyl-1-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazolů a větší série 2-alkylsulfanyl-5-(3,5-dinitrofenyl)-1,3,4-oxadiazolů [P10, P17]. Syntézu tetrazolových reverzních analogů komplikovaly nízké výtěžky výchozího 1-(3,5-dinitrofenyl)-1*H*-tetrazol-5-thiolu, i z tohoto důvodu jim byla věnována menší pozornost. Nicméně 3 připravené látky vykázaly submikromolární antimykobakteriální účinnost [P10]. Reverzní 3,5-dinitrofenyloxadiazolové deriváty překvapivě vykázaly antimykobakteriální účinnost srovnatelnou či dokonce vyšší než předlohové 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazoly – MIC většiny připravených derivátů byla 0,03 μM (Schéma 14). Antimykobakteriální účinek

reverzních analogů zůstal vysoce selektivní. Studované látky opět nevykazovaly účinnost proti bakteriálním ani fungálním kmenům a neovlivňovaly viabilitu lidských buněčných linií až do koncentrace 30 μM . Ze strukturně-aktivitní studie vyplynul zásadní rozdíl mezi těmito látkami a jejich předlohami. U reverzních 3,5-dinitrofenyloxadiazolů bylo možné zaměnit jednu nitroskupinu za elektronakceptorovou trifluormethylovou skupinu, aniž by došlo ke ztrátě účinku. Jiné provedené záměny nitroskupiny pak opět vedly ke ztrátě účinku [P10]. Zjištěný účinek trifluormethylových analogů vedl opět k hypotéze možné inhibice DprE1. Podobnost studovaných látek s výše zmíněnými inhibitory DprE1^{17, 21, 50} byla ještě markantnější. Avšak experimenty provedené doc. Mikušovou nevedly k jednoznačným závěrům a mechanismus účinku reverzních oxadiazolových analogů je tak nadále předmětem zkoumání.

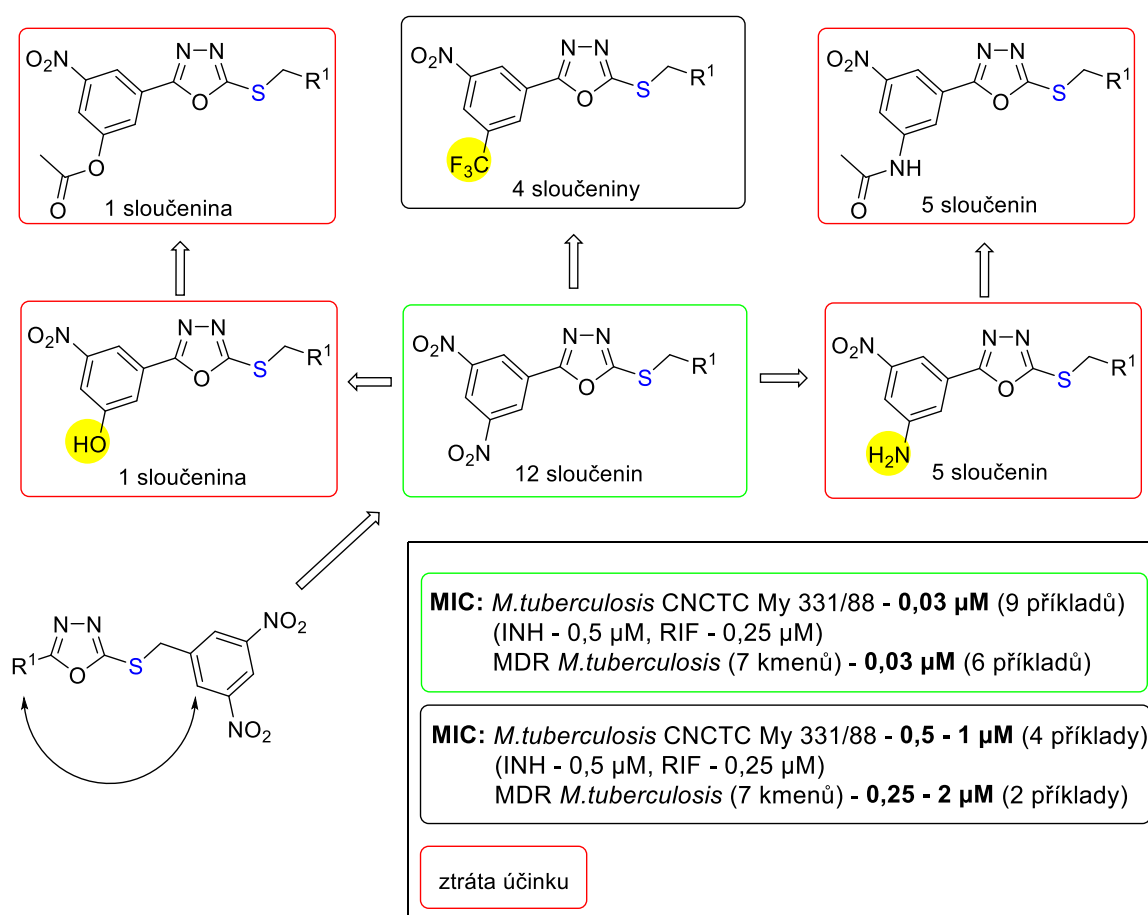


Schéma 14. Obecné schéma látek připravených ve strukturně-aktivitní studii 3,5-dinitrofenyl oxadiazolových derivátů [P10].

Další obměny tetrazolových látek spočívaly v postupném odstranění methylsulfanylového spojovacího řetězce mezi tetrazolem a 3,5-dinitrofenylovou

skupinou. Tak byla připravena malá série 1-substituovaných 5-(3,5-dinitrofenyl)sulfanyl-1*H*-tetrazolů bez methylenové skupiny ve spojovacím řetězci, jejichž antimykobakteriální účinnost byla srovnatelná s předlohovými látkami, a konečně rozsáhlá série 5-(3,5-dinitrofenyl)tetrazolových derivátů se substituentem v poloze 1 a především 2 tetrazolu (Schéma 15) [P11, P18, P19, P20]. Obdobně jako v předchozí studii tetrazolových regioisomerů [P8] i v této sérii vykázaly 2-substituované tetrazoly vyšší antimykobakteriální aktivitu ve srovnání s 1-regioisomery. Nejúčinnější derivát s 4-methoxybenzylovou skupinou v poloze 2 tetrazolu dosáhl MIC 0,03 μM proti *M. tuberculosis*, což je hodnota cca 100 \times vyšší než u 1-substituovaného isomeru.

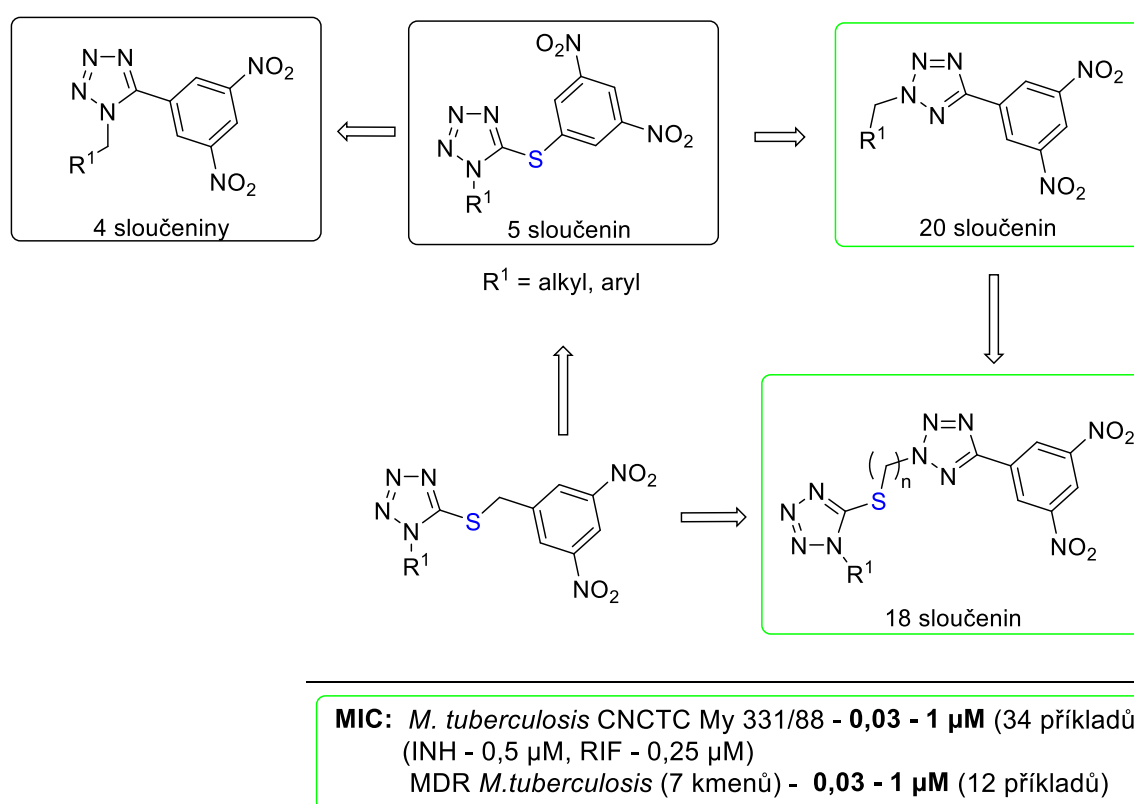
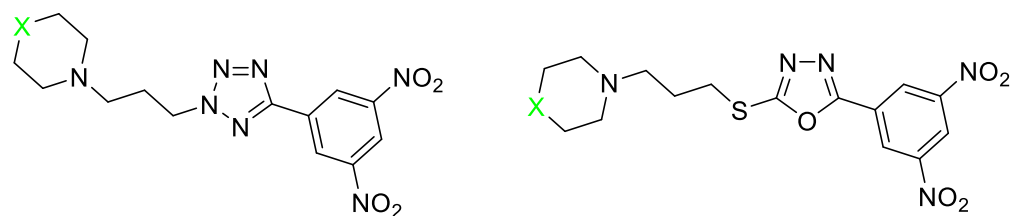


Schéma 15. Obecné schéma látek připravených ve strukturně-aktivitní studii 3,5-dinitrofenyl tetrazolových derivátů [P11, P18, P19, P20].

Vložením 1-substituovaného tetrazol-5-thiolu do substituentu R^1 pak byla připravena série látek s vystupňovaným antimykobakteriálním účinkem. Antimykobakteriální účinek připravených látek byl vysoce selektivní, stejně jako u látek z předchozích sérií. Velkou předností jednoduchých 2-substituovaných 5-(3,5-dinitrofenyl)-2*H*-tetrazolů je jejich

snadná a levná syntéza a absence atomu síry v molekule [P11, P18, P20]. I v tomto případě jsme přistoupili k přípravě ve vodě rozpustných derivátů. K tomu jsme využili stejnou strategii jako u látek v kapitole 2.2.1. Do substituentu R¹ jsme vložili nasycený dusíkatý heterocykl, který umožnil přípravu ve vodě rozpustných solí [P12]. Účinnost derivátů se opět odvíjela od lipofility postranního řetězce (Tabulka 3). Nejúčinnější *N*-benzylpiperazinové deriváty se účinností přiblížili INH, v podobě dihydrochloridů byly dobře rozpustné ve vodě a *in vitro* neovlivňovaly viabilitu lidských buněčných linií. Z tohoto důvodu představují vhodné kandidáty pro *in vivo* studie a další strukturní optimalizace.

Tabulka 3. Antimykobakteriální účinnost 3,5-dinitrofenyl tetrazolových a oxadiazolových látek s bazickým dusíkatým heterocyklem v postranním řetězci [P12].



X	CLog P	MIC (μM) (<i>M.tuberculosis</i>)	X	CLog P	MIC (μM) (<i>M.tuberculosis</i>)
NCH ₃	0,64	>32	NCH ₃	0,50	>32
O	1,55	16	O	1,41	8
CH ₂	2,77	4	CH ₂	2,62	8
NBn	3,84	1	NBn	3,69	0,125
INH		0,5	INH		0,5

3. SOUHRN, ZÁVĚRY A MOŽNÉ SMĚRY DALŠÍHO VÝZKUMU

Během posledních 6 let se naší pracovní skupině podařilo připravit několik sérií heterocyklických sloučenin obsahujících 3,5-dinitrofenylovou skupinu s vysokou a selektivní *in vitro* antituberkulotickou účinností a částečně objasnit vztahy mezi jejich strukturou a účinností. Nutno poznamenat, že zdaleka ne všechny strukturní obměny, připravené série látek a výsledky *in vitro* i *in vivo* studií provedených ve spolupráci s domácími i zahraničními pracovišti byly do dnešního dne zveřejněny. O některých nepublikovaných výsledcích bych se rád zmínil i v této kapitole.

Z mého pohledu nejzajímavější skupinou námi připravených a popsanych látek jsou 3,5-dinitrobenzylsulfanyl oxadiazoly a thiadiazoly. Díky jejich neobvykle efektivní účinnosti proti nereplikujícím se kmenům mykobakterií bylo především v EPFL v Lausanne provedeno několik dalších pokročilých experimentů. Podařilo se vygenerovat kmeny *M. tuberculosis* rezistentní k těmto látkám a pomocí kompletní genomové sekvenace byly určeny enzymy, jejichž mutace vedly k získání rezistence mykobakterií vůči těmto látkám. Bohužel, výsledek nevedl k jednoznačnému určení molekulárního cíle těchto látek v mykobakteriích, nicméně navedl nás na určitý směr, ve kterém v současnosti probíhají další experimenty.

Z pohledu farmaceutické chemie jsme v tuto chvíli částečně opustili důkladně probádaný 3,5-dinitrofenylový fragment a zaměřili jsme se na atom síry v těchto molekulách, jelikož ten je metabolicky rychle oxidován na sulfoxid a sulfon, což vede k rozpadu molekuly a ztrátě účinku. To zabraňuje těmto látkám přenést svůj antituberkulotický účinek i do podmínek *in vivo*. Bylo připraveno několik karbaanalogů, azaanalogů, a dále sloučenin se stericky chráněným atomem síry. Tyto série budou dokončeny a pomohou nám odhalit roli síry v antimykobakteriálním účinku a možnosti jejího nahrazení.

Další sérií látek, jejich detailní strukturně-aktivitní studii v současnosti dokončujeme, je série 3,4,5-trisubstituovaných 1,2,4-triazol-3-thiolů. Některé z těchto látek již jsou obsaženy v národním patentu [P17], avšak právě 3 možnosti umístění klíčového 3,5-dinitrofenylového uskupení na 1,2,4-triazol-3-thiol umožňují přípravu mnoha regioisomerů a analogů.

Druhou velkou skupinou látek popsaných v posledních letech jsou 3,5-dinitrofenyl tetrazoly a oxadiazoly. Ačkoli vybrané látky z těchto sérií prokázaly vynikající *in vitro* účinnost proti standardním kmenům mykobakterií, proti nereplikujícím se mykobakteriím jsou prakticky neúčinné. Účinnost proti nereplikujícím se kmenům je jedním ze základních požadavků pro potenciální léčiva proti TB, proto nebylo s těmito látkami provedeno tolik pokročilých experimentů jako s předchozí skupinou látek. Co se mechanismu účinku týká, již v kapitole 2.2.2 jsem se zmínil, že experimenty s inhibicí DprE1 nebyly zcela průkazné. Některé látky mírně inhibovaly DprE1, avšak v koncentracích dalece převyšujících jejich MIC. Nepřímý důkaz hovořící pro jiný mechanismus účinku spočívá v aktivitě látek proti kmeni *M. avium*. *M. avium* je totiž přirozeně rezistentní proti DprE1 inhibitorům, avšak některé z námi připravených 3,5-dinitrofenyl tetrazolů [P11] i oxadiazolů [P10] byly proti tomuto kmeni účinné s hodnotou MIC v řádu jednotek mikromol na litr.

V následujícím období se zaměříme na přípravu a studium látek z obou výše zmíněných skupin s bazickým centrem v postranním řetězci. Z takových látek by mohly být vyselektovány ty s vhodnými vlastnostmi pro *in vivo* studie antituberkulotické účinnosti.

4. SEZNAM ZKRATEK

AČR	Armáda České republiky
ATP	adenosintrifosfát
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur
DprE1	dekaprenylfosforyl- β -D-ribóza-2'-oxidáza
EMB	ethambutol
EPFL	École polytechnique fédérale de Lausanne
HIV	human immunodeficiency virus
INH	isoniazid
MDR	multilékově rezistentní
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
TB	tuberkulóza
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR	extenzivně rezistentní

5. LITERATURA

5.1. Citace vlastních prací

5.1.1. Původní práce

- P1. Myznikov, L. V.; Roh, J.; Artamonova, T. V.; Hrabalek, A.; Koldobskii, G. I. Tetrazoles: LI. Synthesis of 5-substituted tetrazoles under microwave activation. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43*, 765-767.
- P2. Roh, J.; Artamonova, T. V.; Vavrova, K.; Koldobskii, G. I.; Hrabalek, A. Practical Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles under Microwave Irradiation. *Synthesis* **2009**, 2175-2178.
- P3. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot regioselective vinylation of tetrazoles: preparation of 5-substituted 2-vinyl-2H-tetrazoles. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1411-1414.
- P4. Novakova, V.; Roh, J.; Gela, P.; Kunes, J.; Zimcik, P. Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4326-4328.
- P5. Karabanovich, G.; Roh, J.; Padelkova, Z.; Novak, Z.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot synthesis of 1-substituted-5-alkylselenanyl-1H-tetrazoles from isoselenocyanates: unexpected formation of N-alkyl-N-arylcyanamides and (Z)-Se-alkyl-N-cyano-N,N'-diarylisoselenoureas. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8798-8808.
- P6. Myznikov, L.; Dmitrieva, U.; Artamonova, T.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Zevatskii, Y. An Efficient Synthesis of 1-Substituted 5-Bromo-1H-tetrazoles. *Synthesis* **2013**, *45*, 2029-2033.
- P7. Karabanovich, G.; Roh, J.; Smutný, T.; Němeček, J.; Vicherek, P.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Dufková, I.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. 1-Substituted-5-[(3,5-Dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-Tetrazoles and Their Isosteric Analogs: A New Class of Selective Antitubercular Agents Active against Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 324-340.

- P8. Karabanovich, G.; Roh, J.; Soukup, O.; Pávková, I.; Pasdiorová, M.; Tambor, V.; Stolaříková, J.; Vejšová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. Tetrazole Regioisomers in the Development of Nitro Group-Containing Antitubercular Agents. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 174-181.
- P9. Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejšová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-Oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362–2380.
- P10. Karabanovich, G.; Němeček, J.; Valášková, L.; Carazo, A.; Konečná, K.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Pavliš, O.; Pávek, P.; Vávrová, K.; Roh, J.; Klimešová, V. S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 369-383.
- P11. Němeček, J.; Sychra, P.; Macháček, M.; Benková, M.; Karabanovich, G.; Konečná, K.; Kavková, V.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Soukup, O.; Roh, J.; Klimešová, V. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *130*, 419-432.
- P12. Roh, J.; Karabanovich, G.; Vlčková, H.; Carazo, A.; Němeček, J.; Sychra, P.; Valášková, L.; Pavliš, O.; Stolaříková, J.; Klimešová, V.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Hrabálek, A. Development of Water-Soluble 3,5-Dinitrophenyl Tetrazole and Oxadiazole Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.08.010

5.1.2. Přehledové práce

- P13. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6101-6118.

5.1.3. Patenty a patentové přihlášky

- P14. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný tetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305622 B6, 2016.
- P15. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný diazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305680 B6, 2016.
- P16. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Oxa- and thia-diazoles useful in the treatment of Tuberculosis. Patent WO2014/161516 A1, 2014.
- P17. Karabanovich, G.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Pávek, P. Dinitrofenyloxadiazol nebo -triazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306408 B6, 2017.
- P18. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituovaný fenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306245 B6, 2016.
- P19. Němeček, J.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P. Substituovaný dinitrofenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306321 B6, 2016.
- P20. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituted phenyltetrazole, its use and pharmaceutical preparation containing it. Patent WO2016/091228 A1, 2016.
- P21. Čonka, P.; Hrabálek, A.; Karabanovich, G.; Němeček, J.; Klimešová, V.; Valášková, L.; Roh, J. Substituovaný nitrobenzyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Přihláška vynálezu PV 2015-444, 2015.

5.2. Citace literatury ostatních autorů

1. World Health Organization, Tuberculosis fact sheet, Reviewed March 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
2. World Health Organization, Global tuberculosis report 2016. <http://www.who.int/tb>.
3. Douste-Blazy, P. 14,600 pills over two years – there has to be a better way to treat TB, *The Guardian* **2016**, <https://www.theguardian.com/global-development/2016/mar/24/pills-treat-tb-research-multi-drug-resistant-tuberculosis>.
4. Public Health England, Tuberculosis in England: annual report, <https://www.gov.uk/government/publications/tuberculosis-in-england-annual-report>.
5. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016, <http://www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2016>.
6. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care 2017 UPDATE. http://www.who.int/tb/publications/2017/dstb_guidance_2017/en/.
7. WHO treatment guidelines for drug resistant tuberculosis OCTOBER 2016 REVISION, <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/treatment/resources/en/>.
8. Working group on new TB drugs, <http://www.newtbdugs.org/pipeline/clinical>.
9. Diacon, A. H.; Pym, A.; Grobusch, M. P.; de los Rios, J. M.; Gotuzzo, E.; Vasilyeva, I.; Leimane, V.; Andries, K.; Bakare, N.; De Marez, T.; Haxaire-Theeuwes, M.; Lounis, N.; Meyvisch, P.; De Paepe, E.; van Heeswijk, R. P. G.; Dannemann, B.; Grp, T. C. S. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Culture Conversion with Bedaquiline. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 723-732.
10. Kakkar, A. K.; Dahiya, N. Bedaquiline for the treatment of resistant tuberculosis: Promises and pitfalls. *Tuberculosis* **2014**, *94*, 357-362.
11. Gler, M. T.; Skripconoka, V.; Sanchez-Garavito, E.; Xiao, H. P.; Cabrera-Rivero, J. L.; Vargas-Vasquez, D. E.; Gao, M. Q.; Awad, M.; Park, S. K.; Shim, T. S.; Suh, G. Y.; Danilovits, M.; Ogata, H.; Kurve, A.; Chang, J.; Suzuki, K.; Tupasi, T.; Koh, W. J.; Seaworth, B.; Geiter, L. J.; Wells, C. D. Delamanid for Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2151-2160.
12. Skripconoka, V.; Danilovits, M.; Pehme, L.; Tomson, T.; Skenders, G.; Kummik, T.; Cirule, A.; Leimane, V.; Kurve, A.; Levina, K.; Geiter, L. J.; Manissero, D.; Wells, C. D. Delamanid improves outcomes and reduces mortality in multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Resp. J.* **2013**, *41*, 1393-1400.
13. Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E., III. PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science* **2008**, *322*, 1392-1395.

14. Manjunatha, U.; Boshoff, H. I.; Barry, C. E. The mechanism of action of PA-824: Novel insights from transcriptional profiling. *Commun. Integr. Biol.* **2009**, *2*, 215-8.
15. Dawson, R.; Diacon, A. H.; Everitt, D.; van Niekerk, C.; Donald, P. R.; Burger, D. A.; Schall, R.; Spigelman, M.; Conradie, A.; Eisenach, K.; Venter, A.; Ive, P.; Page-Shipp, L.; Variava, E.; Reither, K.; Ntinginya, N. E.; Pym, A.; von Groote-Bidlingmaier, F.; Mendel, C. M. Efficiency and safety of the combination of moxifloxacin, pretomanid (PA-824), and pyrazinamide during the first 8 weeks of antituberculosis treatment: a phase 2b, open-label, partly randomised trial in patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis. *The Lancet* **2015**, *385*, 1738-1747.
16. Xavier, A. S.; Lakshmanan, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2014**, *5*, 222-224.
17. Makarov, V.; Manina, G.; Mikusova, K.; Mollmann, U.; Ryabova, O.; Saint-Joanis, B.; Dhar, N.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; Lucarelli, A. P.; Milano, A.; De Rossi, E.; Belanova, M.; Bobovska, A.; Dianiskova, P.; Kordulakova, J.; Sala, C.; Fullam, E.; Schneider, P.; McKinney, J. D.; Brodin, P.; Christophe, T.; Waddell, S.; Butcher, P.; Albrethsen, J.; Rosenkrands, I.; Brosch, R.; Nandi, V.; Bharath, S.; Gaonkar, S.; Shandil, R. K.; Balasubramanian, V.; Balganes, T.; Tyagi, S.; Grosset, J.; Riccardi, G.; Cole, S. T. Benzothiazinones Kill Mycobacterium tuberculosis by Blocking Arabinan Synthesis. *Science* **2009**, *324*, 801-804.
18. Makarov, V.; Lechartier, B.; Zhang, M.; Neres, J.; van der Sar, A. M.; Raadsen, S. A.; Hartkoorn, R. C.; Ryabova, O. B.; Vocat, A.; Decosterd, L. A.; Widmer, N.; Buclin, T.; Bitter, W.; Andries, K.; Pojer, F.; Dyson, P. J.; Cole, S. T. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 372-383.
19. Mikusova, K.; Makarov, V.; Neres, J. DprE1-from the Discovery to the Promising Tuberculosis Drug Target. *Curr. Pharm. Design* **2014**, *20*, 4379-4403.
20. Trefzer, C.; Skovierova, H.; Buroni, S.; Bobovska, A.; Nenci, S.; Molteni, E.; Pojer, F.; Pasca, M. R.; Makarov, V.; Cole, S. T.; Riccardi, G.; Mikusova, K.; Johnsson, K. Benzothiazinones Are Suicide Inhibitors of Mycobacterial Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribofuranose 2'-Oxidase DprE1. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 912-915.
21. Christophe, T.; Jackson, M.; Jeon, H. K.; Fenistein, D.; Contreras-Dominguez, M.; Kim, J.; Genovesio, A.; Carralot, J. P.; Ewann, F.; Kim, E. H.; Lee, S. Y.; Kang, S.; Seo, M. J.; Park, E. J.; Skovierova, H.; Pham, H.; Riccardi, G.; Nam, J. Y.; Marsollier, L.; Kempf, M.; Joly-Guillou, M. L.; Oh, T.; Shin, W. K.; No, Z.; Nehrbass, U.; Brosch, R.; Cole, S. T.; Brodin, P. High Content Screening Identifies Decaprenyl-Phosphoribose 2' Epimerase as a Target for Intracellular Antimycobacterial Inhibitors. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000645.
22. Magnet, S.; Hartkoorn, R. C.; Szekely, R.; Pato, J.; Triccas, J. A.; Schneider, P.; Szantai-Kis, C.; Orfi, L.; Chambon, M.; Banfi, D.; Bueno, M.; Turcatti, G.; Keri, G.; Cole, S. T. Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 354-360.
23. Stanley, S. A.; Grant, S. S.; Kawate, T.; Iwase, N.; Shimizu, M.; Wivagg, C.; Silvis, M.; Kazyanskaya, E.; Aquadro, J.; Golas, A.; Fitzgerald, M.; Dai, H.; Zhang, L.; Hung, D. T. Identification of Novel Inhibitors of M. tuberculosis Growth Using Whole Cell Based High-Throughput Screening. *Acs Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1377-1384.

24. Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E.; Boshoff, H. I. SQ109 Targets MmpL3, a Membrane Transporter of Trehalose Monomycolate Involved in Mycolic Acid Donation to the Cell Wall Core of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1797-1809.
25. Boeree, M. J.; Heinrich, N.; Aarnoutse, R.; Diacon, A. H.; Dawson, R.; Rehal, S.; Kibiki, G. S.; Churchyard, G.; Sanne, I.; Ntinginya, N. E.; Minja, L. T.; Hunt, R. D.; Charalambous, S.; Hanekom, M.; Semvua, H. H.; Mpagama, S. G.; Manyama, C.; Mtafya, B.; Reither, K.; Wallis, R. S.; Venter, A.; Narunsky, K.; Mekota, A.; Henne, S.; Colbers, A.; van Balen, G. P.; Gillespie, S. H.; Phillips, P. P. J.; Hoelscher, M. High-dose rifampicin, moxifloxacin, and SQ109 for treating tuberculosis: a multi-arm, multi-stage randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, 39-49.
26. Wallis, R. S.; Jakubiec, W.; Kumar, V.; Bedarida, G.; Silvia, A.; Paige, D.; Zhu, T.; Mitton-Fry, M.; Ladutko, L.; Campbell, S.; Miller, P. F. Biomarker-Assisted Dose Selection for Safety and Efficacy in Early Development of PNU-100480 for Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 567-574.
27. Jeong, J. W.; Jung, S. J.; Lee, H. H.; Kim, Y. Z.; Park, T. K.; Cho, Y. L.; Chae, S. E.; Baek, S. Y.; Woo, S. H.; Lee, H. S.; Kwak, J. H. In Vitro and In Vivo Activities of LCB01-0371, a New Oxazolidinone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 5359-5362.
28. Working group on new TB drugs, Clinical pipeline, https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical?field_advancing_value=All&field_biologic_value=0&=Apply.
29. Carini, D. J.; Duncia, J. V.; Aldrich, P. E.; Chiu, A. T.; Johnson, A. L.; Pierce, M. E.; Price, W. A.; Santella, J. B.; Wells, G. J.; Wexler, R. R.; Wong, P. C.; Yoo, S. E.; Timmermans, P. B. M. W. M. Nonpeptide angiotensin-II receptor antagonists - the discovery of a series of N-(biphenylmethyl)imidazoles as potent, orally active antihypertensives. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2525-2547.
30. Finnegan, W. G.; Henry, R. A.; Lofquist, R. An Improved Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3908-3911.
31. Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. Preparation of 5-substituted 1*H*-tetrazoles from nitriles in water. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7945-7950.
32. Aureggi, V.; Sedelmeier, G. 1,3-dipolar cycloaddition: Click chemistry for the synthesis of 5-substituted tetrazoles from organoaluminum azides and nitriles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8440-8444.
33. Cantillo, D.; Gutmann, B.; Kappe, C. O. Mechanistic Insights on Azide-Nitrile Cycloadditions: On the Dialkyltin Oxide-Trimethylsilyl Azide Route and a New Vilsmeier-Haack-Type Organocatalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4465-4475.
34. Katritzky, A. R.; Cai, C. M.; Meher, N. K. Efficient synthesis of 1,5-disubstituted tetrazoles. *Synthesis* **2007**, 1204-1208.
35. Duncia, J. V.; Pierce, M. E.; Santella, J. B. Three Synthetic Routes to a Sterically Hindered Tetrazole - A New One-Step Mild Conversion of an Amide into a Tetrazole. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2395-2400.

36. Nelson, D. W.; Gregg, R. J.; Kort, M. E.; Perez-Medrano, A.; Voight, E. A.; Wang, Y.; Grayson, G.; Namovic, M. T.; Donnelly-Roberts, D. L.; Niforatos, W.; Honore, P.; Jarvis, M. F.; Faltynek, C. R.; Carroll, W. A. Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3659 - 3666.
37. Moderhack, D. Ring transformations in tetrazole chemistry. *J. Prakt. Chem.* **1998**, *340*, 687-709.
38. Efimova, Y. A.; Artamonova, T. V.; Koldobskii, G. I. Tetrazoles: LIII. Microwave-Activated Acylation of 5-Substituted Tetrazoles. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, *44*, 1345-1347.
39. Adamec, J.; Waisser, K.; Kunes, J.; Kaustova, J. A note on the antitubercular activities of 1-aryl-5-benzylsulfanyl tetrazoles. *Arch. Pharm.* **2005**, *338*, 385-389.
40. Waisser, K.; Kunes, J.; Hrabalek, A.; Odlerova, Z. Antitubercotics .66. New groups of potential antitubercotics - bis(1-aryltetrazol-5-yl) disulfides - structure-activity relationship. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1994**, *59*, 234-238.
41. Waisser, K.; Adamec, J.; Dolezal, R.; Kaustova, J. 1-Aryl-5-benzylsulfanyl tetrazoles, a new group of antimycobacterial compounds against potentially pathogenic strains. *Folia Microbiol.* **2005**, *50*, 195-197.
42. Nedvidkova, J.; Stolba, P.; Strbak, V.; Vanzura, J.; Hrabalek, A.; J. V. The effect of 1-p-bromophenyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazole (Br FMT) on thyroid gland function in rats. *Cesk. Farm.* **1991**, *40*, 75.
43. Altland, H. W. Smiles Rearrangement of 2-Tetrazolythio-3-aminopyridines. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3395-3399.
44. Goltsberg, M. A.; Koldobskii, G. I. Tetrazoles .31. Reactions of 1-R-tetrazole-5-thiones and their derivatives under the phase transfer catalysis. *Zh. Org. Khim.* **1996**, *32*, 1238-1245.
45. Goltsberg, M. A.; Koldobskii, G. I. Simple method for the preparation of 5-alkoxy(aryloxy)-1-phenyltetrazoles. *Zh. Org. Khim.* **1995**, *31*, 1726-1727.
46. Zarghi, A.; Faizi, M.; Shafaghi, B.; Ahadian, A.; Khojastehpoor, H. R.; Zanganeh, V.; Tabatabai, S. A.; Shafiee, A. Design and synthesis of new 2-substituted-5-(2-benzylthiophenyl)1,3,4-oxadiazoles as benzodiazepine receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3126-3129.
47. Baron, M.; Wilson, C. V. 2-Substituted-1,3,4-Oxa and Thia-Diazoline-5-Thiones. *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 1021-1023.
48. Klimesova, V.; Koci, J.; Pour, M.; Stachel, J.; Waisser, K.; Kaustova, J. Synthesis and preliminary evaluation of benzimidazole derivatives as antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 409-418.
49. Koci, J.; Klimesova, V.; Waisser, K.; Kaustova, J.; Dahse, H. M.; Mollmann, U. Heterocyclic benzazole derivatives with antimycobacterial in vitro activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3275-3278.
50. Trefzer, C.; Rengifo-Gonzalez, M.; Hinner, M. J.; Schneider, P.; Makarov, V.; Cole, S. T.; Johnsson, K. Benzothiazinones: Prodrugs That Covalently Modify the

Decaprenylphosphoryl-beta-D-ribose 2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Am. Chem. Soc. **2010**, *132*, 13663-13665.

6. PODÍL PŘEDKLADATELE HABILITAČNÍ PRÁCE NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

6.1. Původní práce

Ad P1. Syntéza všech látek

Ad P2. První a korespondující autor

Ad P3. První a korespondující autor

Ad P4. Syntéza a charakterizace všech prekurzorů pro přípravu finálních látek

Ad P5. Korespondující autor

Ad P6. Vedení části syntetické práce, podíl na sepsání práce

Ad P7. Korespondující autor

Ad P8. Korespondující autor

Ad P9. Korespondující autor

Ad P10. Korespondující autor

Ad P11. Korespondující autor

Ad P12. První a korespondující autor

6.2. Přehledové práce

Ad P13. První a korespondující autor

6.3. Patenty

- Ad P14. Podíl na přípravě sloučenin a sepsání patentu
- Ad P15. Podíl na přípravě sloučenin a sepsání patentu
- Ad P16. Podíl na přípravě sloučenin a sepsání patentu
- Ad P17. Sepsání patentu, patentových nároků, jednání s patentovým zástupcem
- Ad P18. Sepsání patentu, patentových nároků, jednání s patentovým zástupcem
- Ad P19. Sepsání patentu, patentových nároků, jednání s patentovým zástupcem
- Ad P20. Sepsání patentu, patentových nároků, jednání s patentovým zástupcem
- Ad P21. Sepsání patentu, patentových nároků, jednání s patentovým zástupcem

6.4. Původní práce nezahrnuté v habilitační práci

- P22. Vavrova, K.; Kovarikova, P.; Skolova, B.; Libalova, M.; Roh, J.; Cap, R.; Holy, A.; Hrabalek, A. Enhanced Topical and Transdermal Delivery of Antineoplastic and Antiviral Acyclic Nucleoside Phosphonate cPr-PMEDAP. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 3105-3115.

Podíl práce: konzultace při vyhodnocování výsledků a sepsování práce

- P23. Janusova, B.; Skolova, B.; Tukorova, K.; Wojnarova, L.; Simunek, T.; Mladenka, P.; Filipicky, T.; Riha, M.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers. *J. Control. Release* **2013**, *165*, 91-100.

Podíl práce: charakterizace sloučenin

- P24. Skolova, B.; Janusova, B.; Zbytovska, J.; Gooris, G.; Bouwstra, J.; Slepicka, P.; Berka, P.; Roh, J.; Palat, K.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. Ceramides in the Skin Lipid Membranes: Length Matters. *Langmuir* **2013**, *29*, 15624-15633.

Podíl práce: charakterizace sloučenin, konzultace při vyhodnocování výsledků

- P25. Kovacik, A.; Roh, J.; Vavrova, K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1555-1562. (přehledový článek)

Podíl práce: podíl na sepisování manuskriptu

- P26. Skolova, B.; Hudská, K.; Pullmannová, P.; Kovacik, A.; Palat, K.; Roh, J.; Fleddermann, J.; Estrela-Lopis, I.; Vavrova, K. Different Phase Behavior and Packing of Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyls in Model Membranes: Infrared Spectroscopy Using Deuterated Lipids. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10460-10470.

Podíl práce: konzultace při vyhodnocování výsledků a sepisování práce

- P27. Skolova, B.; Jandovská, K.; Pullmannová, P.; Tesar, O.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. The Role of the Trans Double Bond in Skin Barrier Sphingolipids: Permeability and Infrared Spectroscopic Study of Model Ceramide and Dihydroceramide Membranes. *Langmuir* **2014**, *30*, 5527-5535.

Podíl práce: konzultace při vyhodnocování výsledků a sepisování práce

- P28. Stariat, J.; Suprunova, V.; Roh, J.; Sestak, V.; Eisner, T.; Filipsky, T.; Mladenka, P.; Nobilis, M.; Simunek, T.; Klimes, J.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R.; Kovarikova, P. Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent, Bp4eT, and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats. *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 621-629.

Podíl práce: příprava studovaných látek a jejich metabolitů

- P29. Diblikova, D.; Kopecna, M.; Skolova, B.; Kremerova, M.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Vavrova, K. Transdermal Delivery and Cutaneous Targeting of Antivirals using a Penetration Enhancer and Lysolipid Prodrugs. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1071-1081.

Podíl práce: charakterizace sloučenin, konzultace při vyhodnocování výsledků

- P30. Jirkovská-Vavrova, A.; Roh, J.; Lencova-Popelova, O.; Jirkovsky, E.; Hruskova, K.; Potuckova-Mackova, E.; Jansova, H.; Haskova, P.; Martinkova, P.; Eisner, T.; Kratochvil, M.; Sus, J.; Machacek, M.; Vostatková-Tichotova, L.; Gersl, V.; Kalinowski, D. S.; Muller, M. T.; Richardson, D. R.; Vavrova, K.; Sterba, M.; Simunek, T. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its opening hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicol. Res.* **2015**, *4*, 1098-1114.

Podíl práce: syntéza a charakterizace všech studovaných látek

- P31. Sestak, V.; Stariat, J.; Cermanova, J.; Potuckova, E.; Chladek, J.; Roh, J.; Bures, J.; Jansova, H.; Prusa, P.; Sterba, M.; Micuda, S.; Simunek, T.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R.; Kovarikova, P. Novel and potent anti-tumor and anti-metastatic di-2-pyridylketone thiosemicarbazones demonstrate marked differences in pharmacology between the first and second generation lead agents. *Oncotarget* **2015**, *6*, 42411-42428.

Podíl práce: syntéza a charakterizace studovaných chelátorů a jejich metabolitů

- P32. Opalka, L.; Kovacik, A.; Sochorova, M.; Roh, J.; Kunes, J.; Lenco, J.; Vavrova, K. Scalable Synthesis of Human Ultralong Chain Ceramides. *Organic Letters* **2015**, *17*, 5456-5459.

Podíl práce: konzultace syntetických postupů, charakterizace sloučenin

- P33. Potuckova, E.; Roh, J.; Machacek, M.; Sahni, S.; Stariat, J.; Sestak, V.; Jansova, H.; Haskova, P.; Jirkovska, A.; Vavrova, K.; Kovarikova, P.; Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R.; Simunek, T. In Vitro Characterization of the Pharmacological Properties of the Anti-Cancer Chelator, Bp4eT, and Its Phase I Metabolites. *Plos One* **2015**, *10*, e0139929.

Podíl práce: příprava studovaných chelátorů a jejich metabolitů

- P34. Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V. The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigment*. **2015**, *121*, 178-187.

Podíl práce: charakterizace sloučenin, konzultace při vyhodnocování výsledků a sepsání práce

- P35. Sestak, V.; Roh, J.; Klepalova, L.; Kovarikova, P. A UHPLC-UV-QTOF study on the stability of carfilzomib, a novel proteasome inhibitor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *124*, 365-373.

Podíl práce: charakterizace rozpadových produktů, podíl na sepsání práce

- P36. Jansova, H.; Bures, J.; Machacek, M.; Haskova, P.; Jirkovska, A.; Roh, J.; Wang, Q.; Franz, K. J.; Kovarikova, P.; Simunek, T. Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products. *Toxicology* **2016**, *350*, 15-24.

Podíl práce: syntéza některých ze studovaných sloučenin

- P37. Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Kirakci, K.; Lang, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Metal-Cation Recognition in Water by a Tetrapyrazinoporphyrazine-Based Tweezer Receptor. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2417-2426.

Podíl práce: charakterizace sloučenin, konzultace při vyhodnocování výsledků a sepisování práce

- P38. Kovacik, A.; Opalka, L.; Silarova, M.; Roh, J.; Vavrova, K. Synthesis of 6-hydroxyceramide using ruthenium-catalyzed hydrosilylation-protodesilylation. Unexpected formation of a long periodicity lamellar phase in skin lipid membranes. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 73343-73350.

Podíl práce: konzultace syntetických postupů, charakterizace sloučenin

- P39. Roh, J.; Karabanovich, G.; Novakova, V.; Simunek, T.; Vavrova, K. Large-Scale Synthesis of Piperazine-2,6-dione and Its Use in the Synthesis of Dexrazoxane Analogues. *Synthesis.* **2016**, *48*, 4580-4588.

Podíl práce: první a korespondující autor

- P40. Mezeiova, E.; Korabecny, J.; Sepsova, V.; Hrabnova, M.; Jost, P.; Muckova, L.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Misik, J.; Spilovska, K.; Pham, N.; Pokrievkova, L.; Roh, J.; Jun, D.; Soukup, O.; Kaping, D.; Kuca, K. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules* **2017**, *22*, 1265.

Podíl práce: školitel studentky podílející se na syntéze látek

7. SOUBOR PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH PRACÍ

Publikace jsou řazeny chronologicky dle data přijetí k tisku v daných časopisech. Součástí některých publikací jsou doplňující informace, které nejsou k této habilitační práci přiloženy. Pokud je taková příloha dostupná, je vždy u dané publikace uveden internetový odkaz, na kterém lze příslušné doplňující informace nalézt.

- P1. Myznikov, L. V.; Roh, J.; Artamonova, T. V.; Hrabalek, A.; Koldobskii, G. I. Tetrazoles: LI. Synthesis of 5-substituted tetrazoles under microwave activation. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43*, 765-767.
- P2. Roh, J.; Artamonova, T. V.; Vavrova, K.; Koldobskii, G. I.; Hrabalek, A. Practical Synthesis of 5-Substituted Tetrazoles under Microwave Irradiation. *Synthesis* **2009**, 2175-2178.
- P3. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot regioselective vinylation of tetrazoles: preparation of 5-substituted 2-vinyl-2*H*-tetrazoles. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1411-1414.
- P4. Novakova, V.; Roh, J.; Gela, P.; Kunes, J.; Zimcik, P. Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4326-4328.

Doplňující informace:

<http://www.rsc.org/suppdata/cc/c2/c2cc30942d/c2cc30942d.pdf>

- P5. Karabanovich, G.; Roh, J.; Padelkova, Z.; Novak, Z.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. One-pot synthesis of 1-substituted-5-alkylselenanyl-1*H*-tetrazoles from isoselenocyanates: unexpected formation of *N*-alkyl-*N*-arylcyanamides and (*Z*)-*Se*-alkyl-*N*-cyano-*N,N'*-diaryliselenoureas. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8798-8808.

Doplňující informace:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402013012374>

P6. Myznikov, L.; Dmitrieva, U.; Artamonova, T.; Roh, J.; Hrabalek, A.; Zevatskii, Y. An Efficient Synthesis of 1-Substituted 5-Bromo-1*H*-tetrazoles. *Synthesis* **2013**, *45*, 2029-2033.

P7. Karabanovich, G.; Roh, J.; Smutný, T.; Němeček, J.; Vicherek, P.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Dufková, I.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. 1-Substituted-5-[(3,5-Dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-Tetrazoles and Their Isosteric Analogs: A New Class of Selective Antitubercular Agents Active against Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Mycobacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *82*, 324-340.

Doplňující informace:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414005017>

P8. Karabanovich, G.; Roh, J.; Soukup, O.; Pávková, I.; Pasdiorová, M.; Tambor, V.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A. Tetrazole Regioisomers in the Development of Nitro Group-Containing Antitubercular Agents. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 174-181.

Doplňující informace:

<http://www.rsc.org/suppdata/md/c4/c4md00301b/c4md00301b1.pdf>

P9. Karabanovich, G.; Zemanová, J.; Smutný, T.; Székely, R.; Šarkan, M.; Centárová, I.; Vocat, A.; Pávková, I.; Čonka, P.; Němeček, J.; Stolaříková, J.; Vejsová, M.; Vávrová, K.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Pávek, P.; Cole, S. T.; Mikušová, K.; Roh, J. Development of 3,5-Dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-Oxadiazoles and Thiadiazoles as Selective Antitubercular Agents Active Against Replicating and Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362–2380.

Doplňující informace:

<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/acs.jmedchem.5b00608>

P10. Karabanovich, G.; Němeček, J.; Valášková, L.; Carazo, A.; Konečná, K.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Pavliš, O.; Pávek, P.; Vávrová, K.; Roh, J.; Klimešová, V. S-substituted 3,5-dinitrophenyl 1,3,4-oxadiazole-2-thiols and tetrazole-5-thiols as highly efficient antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *126*, 369-383.

Doplňující informace:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523416309783>

P11. Němeček, J.; Sychra, P.; Macháček, M.; Benková, M.; Karabanovich, G.; Konečná, K.; Kavková, V.; Stolaříková, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Soukup, O.; Roh, J.; Klimešová, V. Structure-activity relationship studies on 3,5-dinitrophenyl tetrazoles as antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *130*, 419-432.

Doplňující informace:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417301411>

P12. Roh, J.; Karabanovich, G.; Vlčková, H.; Carazo, A.; Němeček, J.; Sychra, P.; Valášková, L.; Pavliš, O.; Stolaříková, J.; Klimešová, V.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Hrabálek, A. Development of Water-Soluble 3,5-Dinitrophenyl Tetrazole and Oxadiazole Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.08.010

Doplňující informace:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089617311136>

- P13. Roh, J.; Vavrova, K.; Hrabalek, A. Synthesis and Functionalization of 5-Substituted Tetrazoles. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6101-6118.
- P14. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný tetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305622 B6, 2016.
- P15. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Substituovaný diazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 305680 B6, 2016.
- P16. Hrabálek, A.; Roh, J.; Karabanovich, G.; Klimešová, V.; Němeček, J.; Pávek, P. Oxa- and thia-diazoles useful in the treatment of Tuberculosis. Patent WO2014/161516 A1, 2014.
- P17. Karabanovich, G.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Pávek, P. Dinitrofenyloxadiazol nebo -triazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306408 B6, 2017.
- P18. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituovaný fenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306245 B6, 2016.
- P19. Němeček, J.; Roh, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P. Substituovaný dinitrofenyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Patent CZ 306321 B6, 2016.

- P20. Roh, J.; Němeček, J.; Hrabálek, A.; Klimešová, V.; Karabanovich, G.; Pávek, P.; Sychra, P. Substituted phenyltetrazole, its use and pharmaceutical preparation containing it. Patent WO2016/091228 A1, 2016.
- P21. Čonka, P.; Hrabálek, A.; Karabanovich, G.; Němeček, J.; Klimešová, V.; Valášková, L.; Roh, J. Substituovaný nitrobenzyltetrazol, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. Přihláška vynálezu PV 2015-444, 2015.