

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA II.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové 2010

Petra Graetzová

Poděkování

DP vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001

Děkuji **doc.PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.** za mnoho cenných rad a zkušeností, kterými dopomohl ke vzniku této diplomové práce.

V Hradci Králové dne 15.5.2010

.....

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

15.5.2010

.....

Abstrakt

Název diplomové práce:

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva II.

Vypracovala:

Petra Graetzová

Nárůst HIV pozitivity, migrace obyvatelstva, nevyhovující sociální podmínky v řadě rozvojových zemí či nesprávně vedená léčba v posledních letech přispěly k opětovnému nárůstu onemocnění tuberkulózou. Vznik rezistence na již používaná antituberkulotika je motivací ke hledání nových možností léčby a syntéze potenciálních léčiv. Svou činnost jsem zaměřila na estery kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové. Tyto nové látky byly fyzikálně a chemicky charakterizovány a byly provedeny *in vitro* testy na antimykobakteriální a antifungální aktivitu. Kromě syntézy těchto derivátů je součástí diplomové práce také popis v současnosti používaných léčiv, přístupy k léčbě a několik příkladů nových nadějných antituberkulotik.

Abstract

Title of diploma thesis:

Pyrazine derivatives as potential drugs II.

Presented by:

Petra Graetzová

Rising HIV positivity, migration of people, inconvenient social conditions in a row of underdeveloped countries or wrong administration of therapy contributed to recurrence growth the tuberculosis affection of recent years. The inception of resistance to already used antituberculosis drugs is a motivation for searching new therapeutic possibilities and for synthesis potential drugs. I aimed my activity to esters of 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid. These new substances were characterized physico-chemical and the tests their antimycobacterial and antifungal activity *in vitro* were carried out. Except the synthesis these derivatives is part of the graduation theses also a description of presently used drugs, accesses for therapy and several examples of new hopeful antituberculosis drugs.

Obsah

1	Cíl diplomové práce	7
2	Úvodní část.....	8
2.1	Tuberkulóza (TBC).....	8
2.2	Epidemiologie TBC v ČR.....	9
2.3	Etiologie TBC	13
2.4	Chemické složení mykobakterií.....	14
2.5	Zdroj a přenos nákazy	15
2.6	Prevence.....	16
2.7	Patogeneze TBC	17
2.8	Léčba tuberkulózy.....	18
2.9	Používaná antituberkulotika	19
2.9.1	Základní antituberkulotika.....	19
2.9.2	Antituberkulotika náhradní.....	24
2.10	Potenciální antituberkulotika a jejich mechanismy účinku	27
2.10.1	Estery pyrazin-2-karboxylové kyseliny	27
2.10.2	Substituované estery pyrazin-2-karboxylové kyseliny	28
2.10.3	SQ-109.....	30
2.10.4	PA-824	31
2.10.5	OPC-67683	32
2.10.6	TMC-207	33
2.10.7	Ostatní potenciální antituberkulotika.....	35
2.10.8	Závěr	35
3	Teoretická část.....	36
3.1	Chemické vlastnosti pyrazinového jádra	36
3.2	Příprava <i>N</i> -oxidů pyrazinu.....	37
3.3	Příprava karboxylové kyseliny z amidu kyseliny	37
3.4	Halogenace pyrazinu.....	39
3.5	Homolytická alkylace	41
3.6	Esterifikace	41
3.7	Flash chromatografie	42

3.8	Mikrovlnné záření.....	43
4	Experimentální část	46
4.1	Přístrojové vybavení a chemikálie	46
4.2	Schéma prováděných reakcí	47
4.2.1	Příprava výchozí kyseliny.....	47
4.2.2	Příprava esterů	48
4.3	Příprava 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny	48
4.4	Příprava 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny	49
4.5	Příprava 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	50
4.6	Obecný postup přípravy esterů 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny	51
4.7	Nově připravené estery 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristika	53
4.7.1	Propylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové	53
4.7.2	Isopentylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové.....	54
4.7.3	Isopropylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové	55
4.7.4	Butylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové.....	56
4.7.5	Oktylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové.....	57
4.7.6	Isobutylester kyseliny 5- <i>terc</i> -butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové.....	58
5	Biologické hodnocení	59
5.1	Antimykotická aktivita	59
5.2	Antibakteriální aktivita	61
5.3	Antituberkulotická aktivita	62
5.4	Lipofilita připravených esterů.....	63
6	Diskuse	64
7	Závěr.....	66
8	Použitá literatura.....	68

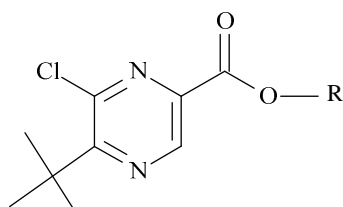
1 Cíl diplomové práce

Záměrem této diplomové práce je syntéza nových biologicky (tj. zejména antimykobakteriálně a antifungálně) aktivních látek odvozených od kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové.

Syntetická činnost prováděná v rámci této diplomové práce je jedním z dílčích příspěvků k řešení výzkumných úkolů Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, která se již řadu let zabývá problematikou syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem.

Konkrétními úkoly bylo:

1. Provést literární rešerši zaměřenou na současnou farmakoterapii tuberkulózy, léčebné režimy a nové trendy v léčbě. Dále byla část práce věnována novým perspektivním látkám.
2. Seznámit se prostřednictvím chemické literatury s metodami přípravy esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravit estery kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové a stanovit jejich základní fyzikálně-chemické charakteristiky.
4. Vypočítat log *P* nově připravených derivátů.
5. Posoudit vztah mezi strukturou, biologickým účinkem (antituberkulózní a antimykotická aktivita) a lipofilitou v sérii připravených látek.



Obecný vzorec připravených esterů

2 Úvodní část

2.1 Tuberkulóza (TBC)

V roce 1882 přednesl Robert Koch v Berlíně sdělení, ve kterém přesně dokumentoval nález etiologického agens - *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Od této chvíle lze tuberkulózu definovat etiologicky, tedy **tuberkulóza představuje všechny chorobné stavy, jejichž příčinou je *Mycobacterium tuberculosis*.**¹

Robert Koch kromě objevu etiologického agens TBC určil i tři postuláty, které musí být splněny, aby byla jednoznačně prokázána příčinná souvislost mezi určitým mikroorganismem a nemocí.

Kochovy postuláty:

- mikroorganismus musí být nalezen v každém případě onemocnění
- mikroorganismus nesmí být nalezen jako nahodilý nebo neškodný parazit při jiném onemocnění
- mikroorganismus po izolaci a kultivaci musí vyvolat po aplikaci hostiteli v čisté kultuře totéž onemocnění¹

TBC je nejstarším infekčním zabijákem lidstva a i dnes je závažnou hrozbou. Světová zdravotnická organizace (WHO) ji přirovnává k časované bombě. Pokud se lidstvu nepodaří zneškodnit tuto „bombu“, může se stát, že jednoho dne bude muset bojovat s chorobou, která bude rezistentní vůči lékům a která se bude šířit vzduchem a bude prakticky stejně nevyléčitelná jako AIDS.

V celosvětovém měřítku TBC zabíjí více lidí než AIDS, malárie a tropické nemoci dohromady. Denně více než 8000 lidí. Optimistické prognózy, které vznikly v roce 1990 na základě kontinuálního, i když pomalého poklesu incidence TBC, že do třetího tisíciletí vstoupíme bez tohoto infekčního onemocnění, jsou dnes jednoznačně utopií. Světová pandemie HIV positivity, narkomanie, migrace obyvatelstva a stále špatná sociálně-ekonomická situace a mnohokrát i nevhodná léčba způsobily novou vlnu nárůstu TBC. Dnes zasahuje více populace než kdykoli předtím.²

2.2 Epidemiologie TBC v ČR

Podstatná část prezentovaných údajů pochází ze zpracovaných dat z Registru tuberkulózy (RTBC). Do roku 2002 (včetně) zpracovával Registr tuberkulózy ÚZIS ČR a registr byl součástí Národního zdravotnického informačního systému (NZIS). Rokem 2002 se tento registr stal součástí Informačního systému orgánů ochrany veřejného zdraví.³

V roce 2008 bylo hlášeno (notifikováno) do Registru tuberkulózy ČR celkem 879 aktivních tuberkulózních onemocnění všech forem a lokalizací, z nichž bylo 793 tuberkulóz dýchacího ústrojí a 86 tuberkulóz jiných lokalizací (extrapulmonální TBC). V relativním počtu představovala tak celková incidence TBC v roce 2008 8,4 TBC/100 000 obyvatel. Jde o téměř přesně stejný počet jako v předcházejícím roce 2007. V tom roce bylo notifikováno celkem 871 případů, z nich 790 činila tuberkulóza dýchacího ústrojí a 81 tuberkulóza jiných lokalizací při celkové incidenci 8,4/100 000 obyvatel. Je to však poprvé od roku 1996, kdy nedošlo k poklesu počtu hlášených, který v předcházejících letech byl vždy v řádu několika procent.

Pokud jde o formy a lokalizace notifikované tuberkulózy, byla v obou letech výrazná převaha TBC dýchacího ústrojí (90 %), plicní forma pak představovala 89 %, resp. 90 % notifikovaných TBC dýchacího ústrojí.

Z jiných lokalizací (extrapulmonálních) byly jak v roce 2008, tak i v roce 2007 nejčastěji postiženy periferní lymfatické uzliny, kosti a klouby. V roce 2008 byly hlášeny čtyři tuberkulózní meningitidy nebo jiná postižení centrálního nervového systému.

V roce 2008 představovali muži 66 % všech hlášených případů, v roce 2007 to bylo 71 %. V porovnání s rokem 2007 se zvýšil počet nakažených cizinců na 186, což představuje 21,16 % z 879 notifikovaných. V roce 2007 to bylo 17,57 %.

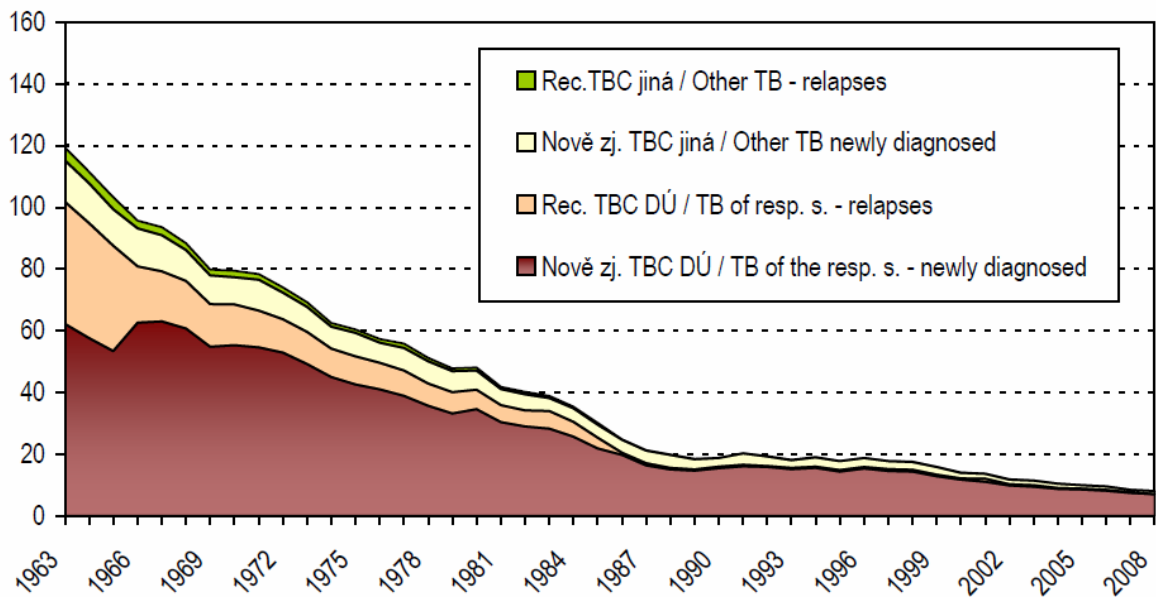
V ČR zemřelo v roce 2008 na tuberkulózu celkem 57 osob, z nich mělo 56 tuberkulózu dýchacího ústrojí. Mortalita tedy byla 0,5/100 000 obyvatel, což je naprosto stejný údaj jako v roce 2007.

V iniciační fázi léčby jsou používána čtyři základní antituberkulotika (včetně pyrazinamidu a ethambutolu) přibližně stejně často, přičemž používání streptomycinu

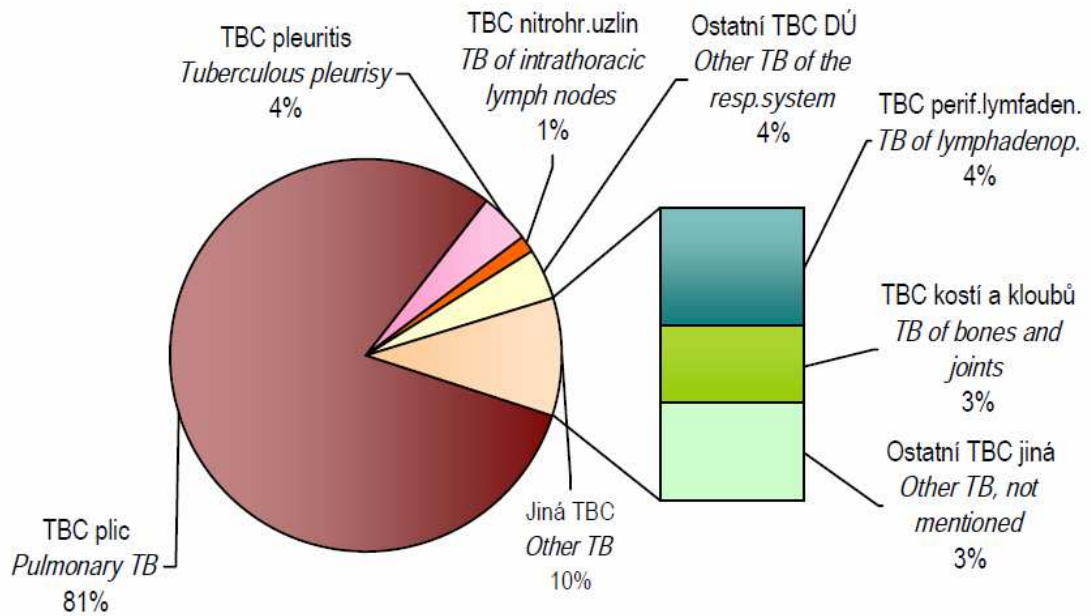
bylo v roce 2008 již značně omezeno (zhruba 10 % v porovnání s isoniazidem a rifampicinem).

Výsledky antituberkulotické léčby spolu s ostatními ukazateli kontroly tohoto onemocnění v ČR v roce 2008 potvrdily, že systém kontroly (soubor všech metod prevence, vyhledávání, diagnostiky a léčení TBC) je u nás stabilizovaný a odpovídá úrovni ostatních vyspělých evropských zemí s nízkou incidencí TBC.³

Obrázek č.1: Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel³



Obrázek č. 2: Struktura hlášené TBC dle diagnóz³



Tabulka č. 1: Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC ³

Rok <i>Year</i>	Hlášená onemocnění TBC <i>Notified cases of TB</i>			
	dýchacího ústrojí <i>respiratory system</i>	jiná <i>other</i>	celkem <i>total</i>	celkem na 100 000 obyv. <i>total per 100 000 inhab.</i>
1989	1 560	345	1 905	18,4
1990	1 647	290	1 937	18,8
1991	1 696	383	2 079	20,2
1992	1 658	328	1 986	19,2
1993	1 601	263	1 864	18,0
1994	1 644	316	1 960	19,0
1995	1 534	300	1 834	17,8
1996	1 636	300	1 936	18,8
1997	1 557	277	1 834	17,8
1998	1 535	270	1 805	17,5
1999	1 369	262	1 631	15,9
2000	1 244	198	1 442	14,0
2001	1 185	165	1 350	13,1
2002	1 037	163	1 200	11,8
2003	1 011	151	1 162	11,4
2004	909	148	1 057	10,4
2005	896	111	1 007	9,9
2006	856	117	973	9,4
2007	790	81	871	8,4
2008	793	86	879	8,4

Tabulka č. 2: Onemocnění mykobakteriózou jinou než TBC ³

Skupina onemocnění	Group of cases	Nemocní mykobakteriózou Cases of mycobacteriosis	
		absolutně number of cases	na 100 000 obyvatel per 100 000 inhabitants
Nově zjištěná onemocnění:	<i>Newly diagnosed cases:</i>		
dýchacího ústrojí	<i>of the respiratory system</i>	85	0,8
jiná	<i>other</i>	5	0,0
Recidivy:	<i>Relapses:</i>		
dýchacího ústrojí	<i>of the respiratory system</i>	6	0,1
jiná	<i>other</i>	-	-
Celkem hlášená onemocnění	<i>Notified cases - total</i>	96	0,9
z toho s izolovaným:	<i>o.w. isolated:</i>		
M. avium (intracellulare)	<i>M. avium (intracellulare)</i>	44	0,4
M. kansasii	<i>M. kansasii</i>	24	0,2
M. xenopi	<i>M. xenopi</i>	12	0,1
M. jiné	<i>M. other</i>	16	0,2

2.3 Etiologie TBC

Původcem TBC je nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis*, tzv. Kochův bacil. Patří do rodu *Mycobacterium*, čeledi *Mycobacteriaceae* a řádu *Actinomycetales*. Rozeznáváme mykobakteria klasická, vyvolávající tuberkulózní onemocnění, a netuberkulózní mykobakteria, vyvolávající mykobakteriózy.⁴

Mezi nejčastěji se vyskytující klasická mykobakteria patří druhy:

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium africanum*

Mycobacterium tuberculosis je v současnosti nejčastějším původcem TBC u člověka. Má velikost 0,3–0,6×1,4 μm. Jeho generační čas *in vitro* je za optimálních podmínek 14–15 hodin, optimální teplota 37 °C, optimum pH 6,4–7,0.

Mycobacterium bovis je všeobecně více patogenní pro zvířata než kmen *Mycobacterium tuberculosis*.

Mycobacterium africanum se vyskytuje převážně v tropické Africe, v Evropě zcela výjimečně. Mikroskopicky se *M. africanum* podobá *M. tuberculosis* a *M. bovis*, mezi kterými tvoří jakýsi přechod.^{4, 5}

Základní vlastností mykobakterií je jejich acidorezistence a alkoholorezistence. Po obarvení anilinovými barvivy (fuchsinem) je není možno odbarvit ani relativně silným roztokem kyseliny, louhu nebo alkoholu. Této vlastnosti se využívá k mikroskopickému průkazu mykobakterií pomocí Ziehl-Neelsonovy metody. Příčinou této rezistence je vysoký obsah tukových látek v těle mykobakterií.

V infekčním materiálu nacházíme mikroskopicky mykobakteria jako rovné nebo lehce zahnuté, granulované tyčinky, s oblými konci o délce 1–4 μm . Mohou být izolovaná, nebo podélně uspořádaná ve shlucích.

Důležitý je vztah mykobakterií k fyzikálním vlivům a chemickým látkám. Kritická teplota, při které dochází k denuraci mykobakteriálních proteinů a mykobakteria hynou, je 60 °C. Naproti tomu chlad, a to i teploty blízké se absolutní nule, bakterie nepoškozují, ve zmrzlém stavu vydrží i léta. Sluneční záření má na mykobakteria baktericidní účinek. Zvláště citlivý je BCG kmen (Bacil Calmette-Guérin). V důsledku slunečního záření se snižuje rovněž účinnost tuberkulínu.⁴

2.4 Chemické složení mykobakterií

Základními chemickými složkami mykobakterií jsou lipidy, proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny a pigmenty. Voda tvoří 60 % živé hmoty.

Lipidy jsou charakteristickým znakem virulentních forem mykobakterií. Jsou složeny z kyseliny mykolové, fosfolipidů, vosku D, glykolipidů (kord faktor, sulfolipidy). Úloha mykobakteriálních lipidů spočívá v jejich toxicitě pro hostitele, snižují mykobaktericidní aktivitu alveolárních makrofágů. Čisté lipidy nejsou antigeny, ale působí jako nosiči proteinů a polysacharidů, kterým se připisuje vlastní antigenní účinek.

Proteiny jsou biologicky neaktivnější částí mykobakterií. Skládají se z několika frakcí, které se podle elektroforetické pohyblivosti označují jako frakce A,B,C a D. Navzájem se od sebe liší molekulovou hmotností a rozličnou antigenovou a hapténovou aktivitou. Proteinové složky navozují jak humorální, tak celulární imunitu.

Polysacharidy jsou rozděleny na dvě třídy – 1. třída zahrnuje ve struktuře arabinosu, galaktosu a manosu, 2. třídu vytváří glukan. Váží se na bakteriální buňku, většinou na proteiny anebo lipidy – lipopolysacharidy. Tyto jsou rozloženy zejména na povrchu buněk a mají důležitou úlohu při permeabilitě.^{1,5}

2.5 Zdroj a přenos nákazy

Zdrojem nákazy v současné době je zejména nemocný člověk, méně domácí a hospodářské zvířectvo (vepři, psi, kočky, slepice) vylučující mykobakteria TBC. Častým zdrojem u člověka je sputum, dále pak sekret z ulcerací a píštělí, popř. také stolice, moč, menstruační krev či sekret z mužských pohlavních orgánů u nemocných mimoplicní TBC.

Tuberkulóza skotu byla jako tzv. bovinní TBC eradikována v celostátním měřítku v roce 1968 likvidací infikovaných zvířat. Tím se prakticky zamezilo infekci alimentární cestou.

Přenos TBC nákazy se uskutečňuje nejčastěji cestou:

- inhalační – v naprosté většině případů vdechováním kapének bronchiálního sekretu nebo volně se vznášejících mikrobů. Infekčnost závisí na počtu mykobakterií v kapénce a na velikosti kapénky. Do dolních cest dýchacích se nejlépe dostanou kapénky o průměru 3 µm.
- přímým kontaktem – obvykle profesionálního původu (veterinární pracovníci, pracovníci v pitevnách či v mikrobiologických laboratořích). Dnes se tato forma objevuje zřídka.

Z toho vyplývá skutečnost, že branou vstupu, resp. nejčastější orgánovou lokalizací TBC u člověka jsou plíce (85-90 %).^{1,4}

2.6 Prevence

K zabránění vzniku onemocnění TBC se uplatňují tři základní preventivní opatření – kalmetizace, izolace zdrojů a chemoprofylaxe.⁴

Kalmetizace neboli **očkování proti TBC** snižuje riziko závažných komplikací a brání vzniku závažných forem TBC – generalizaci hematogenní cestou. Podkladem tzv. BCG vakcinace je arteficiální nákaza mykobakteriemi se sníženou virulencí, což zajišťuje relativní ochranu proti pozdější infekci virulentními kmeny. Tato vakcína nese jméno po francouzských badatelích Calmettovi a Guérinovi, kteří kmen *Mycobacterium bovis* BCG získali. BCG vakcinace snižuje riziko onemocnění TBC, její ochranný mechanismus spočívá v ovlivnění hematogenního rozsevu mykobakterií z místa primoinfekce.

Základní očkování se provádí u novorozenců od 4. dne do 6. týdne života, mají-li porodní váhu větší než 2500 g bez předchozí tuberkulinové reakce. Dříve prováděná revakcinace u dětí ve věku 2-3 a 11 let s negativním tuberkulinovým testem byla dle Vyhlášky č. 65/2009 zrušena. Nejobvyklejším způsobem je intradermální aplikace vakcíny do levého deltového svalu. Lokální vakcinační reakce je známkou úspěšně provedené vakcinace.^{1, 4, 6}

Izolace zdrojů tuberkulózní infekce patří mezi základní preventivní opatření. Nemocní s podezřením nebo již s diagnostikovanou aktivní TBC jsou hospitalizováni na specializovaných pracovištích. Nedílnou součástí prevence TBC jsou opatření přijatá k aktivnímu vyhledávání infikovaných jedinců v okolí zdroje nemoci a zamezení dalšímu šíření infekce.⁴

Chemoprofylaxe je nejčastěji indikována jako ochrana novorozenců a kojenců, kteří přišli do styku s nemocnými vylučujícími mykobakteria TBC, dále při výrazném vzestupu tuberkulinové reakce s ohledem na předchozí hodnoty a také u tuberkulin pozitivních nemocných disponovaných ke vzniku manifestní TBC (AIDS, diabetici, onemocnění hematologickou malignitou).¹

Dále hrají významnou roli všeobecná sociální opatření vedoucí ke zvýšení životního standardu a zdravé životosprávy – výživa, bydlení, dostatečně dlouhý spánek, rekreace, dostatek slunečního záření.¹

2.7 Patogeneze TBC

Onemocnění plicní TBC začíná, jakmile jsou bacily tuberkulózy vdechnuty v dostatečném množství do alveolu (obvykle imunitně oslabeného jedince). V prvním stádiu jsou mykobakteria fagocytována alveolárními makrofágy a eliminována, nebo alespoň inhibována v růstu. U většiny infikovaných osob je vyvinut určitý stupeň přirozené rezistence, která obvykle vede k eliminaci nebo inhibici růstu mykobakterií a k rychlé lokalizaci a vyhojení primoinfekce. Jestliže však alveolární makrofágy nejsou schopny zničit fagocytované bacily nebo inhibovat jejich růst, stávají se naopak prostředím příznivým pro intracelulární růst mykobakterií a dochází k tzv. symbiotickému stádiu. Mykobakteria se logaritmicky množí v cytoplazmě makrofágu, který se nakonec rozpadá a uvolněná mykobakteria jsou vzápětí fagocytována dalšími makrofágy, jež jsou na místo léze atrahovány chemotakticky. Akumulací makrofágů a jejich specificky modifikovaných forem vzniká granulom zvaný tuberkl.

Ve třetím stádiu (zhruba za 30-40 dní po infekci) se začíná uplatňovat specifická imunitní odpověď organismu. Tato má složku buněčnou a tzv. přecitlivělost pozdního typu. Buněčná imunita je zprostředkována aktivovanými makrofágy z krevního oběhu, které jsou výrazně mikrobicidní. Projevem přecitlivělosti pozdního typu je vznik kaseozní nekrózy, v jejímž acelulárním prostředí již mykobakteria nemají podmínky k růstu. Čtvrtým stádiem je zkapalnění kaseozního jádra.

U primoinfekce probíhá patogeneze TBC zpravidla od 1. do 3. stádia. Výjimečně onemocnění pokračuje do 4. stádia jako primární progresivní tuberkulóza. I když se primoinfekce většinou zhojí, *Mycobacterium tuberculosis* mohou přečkávat ve vyhojených lézích v tzv. klidové fázi, což může vést ke znovuzplanutí TBC infekce, tzv. postprimární typ TBC.⁴

Mimoplicní TBC – většina forem mimoplicní TBC vzniká hematogenním rozsevem mykobakterií z původního infekčního ložiska v plicích. Tato vytváří

tuberkulidy, malá infekční ložiska. Většinou, díky vytvořivší se imunitě nemocného vůči infekci, se tato ložiska stanou klinicky němými, obvykle po celou dobu života nemocného.⁴

2.8 Léčba tuberkulózy

Základem léčby TBC je antimikrobiální terapie, prováděná antituberkulotiky. Hlavní zásadou léčby je, aby byla kombinovaná, dlouhodobá a nepřerušovaná. Měla by být kontrolovaná a stanovený léčebný režim by neměl být nemocným svévolně přerušen. Dlouhodobé a kombinované podávání antituberkulotik je nutné vzhledem k heterogenitě populace mykobakterií a pro vyšší procento primárně rezistentních mutant.

Populaci mykobakterií lze dělit na 4 podskupiny:

1. **Rychle se množící mykobakteria**, uložená extracelulárně, v alkalickém prostředí. V tomto prostředí působí baktericidně isoniazid (INH), rifampicin (RMP), streptomycin (STM).
2. **Mykobakteria s nízkou metabolickou aktivitou**, uložená intracelulárně v makrofázích nebo okrajových částech kazeifikované tkáně, v kyselém prostředí. V tomto prostředí působí baktericidně pyrazinamid (PZA), isoniazid (INH), rifampicin (RMP).
3. **Mykobakteria střídající období růstové aktivity a klidu**, spíše v neutrálním prostředí. V tomto prostředí působí baktericidně rifampicin (RMP).
4. „**Spící bacily**“ tj. mykobakteria bez známek metabolické aktivity. Na tato nepůsobí žádné antituberkulotikum.^{1,4}

Léčebné režimy – standardní režimy se liší dle zjištěné citlivosti přítomné mykobakterie na použitá léčiva. V případě, že je citlivost mykobakterie prokázána či předpokládána se v iniciační fázi léčby volí kombinace isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol, ve fázi pokračovací pak isoniazid a rifampicin. V případě rezistence na isoniazid se v pokračovací fázi k použité dvojkombinaci přidá ethambutol. K léčbě tuberkulózní meningitidy by měl být ethambutol vyměněn za streptomycin.

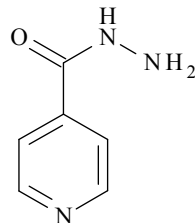
Iniciační fáze léčby trvá dva měsíce, pokračovací fáze následující čtyři měsíce.⁷

2.9 Používaná antituberkulotika

2.9.1 Základní antituberkulotika

Nejvyšší baktericidní účinek mají isoniazid (INH), rifampicin (RMP), a streptomycin (STM). Nejvyšší sterilizační účinek má pyrazinamid (PZA) a rifampicin (RMP). Ethambutol (ETB) působí převážně bakteriostaticky.

Isoniazid



Charakteristika:

Isoniazid je chemicky hydrazid kyseliny pyridin-4-karboxylové (isonikotinové). Působí selektivně a baktericidně na extra- a intracelulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky.⁸

Je účinný také proti *M. bovis* a *M. leprae*.⁵ Pro svůj účinek, ojedinělou toxicitu a nízkou cenu je široce rozšířen k léčbě TBC.

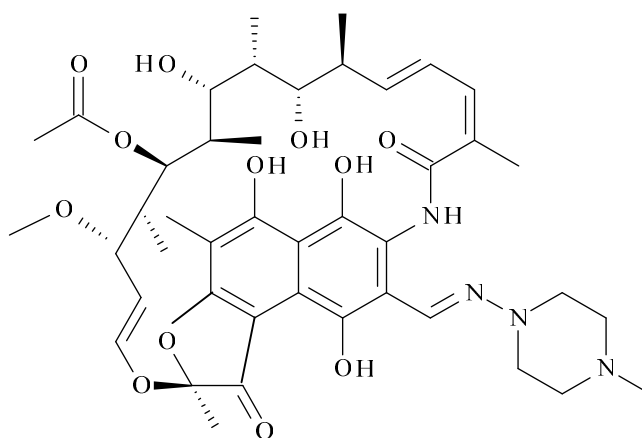
Mechanismus účinku spočívá v interferenci při syntéze kyseliny mykolové, která je nezbytná pro tvorbu buněčné stěny mykobakterií.^{9, 10}

Použití:

Používá se v kombinaci s jinými antituberkulotiky, pouze při profylaxi se vystačí s monoterapií. Klinické použití isoniazidu je v léčbě všech plicních i mimoplicních forem TBC a profylaxe plicních forem. Dobře se vstřebává po perorálním podání, dobře proniká do tělesných tkání a tekutin.^{8, 9}

Ethionamid, patřící taktéž mezi inhibitory syntézy mykolové kyseliny, je považován za antituberkulotikum druhé linie. Thioacetazon, ze stejné skupiny, byl doporučován k terapii TBC v rozvojových zemích vzhledem k jeho nízké ceně a potvrzenému klinickému účinku v kombinaci s isoniazidem.¹¹

Rifampicin



Charakteristika:

Z chemického hlediska se jedná o semisyntetický makrocyclický laktam s bakteriostatickým, ve vyšších dávkách baktericidním účinkem. Rifampicin má široké spektrum účinku, zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie, některé anaeroby, chlamydie a rickettsie. Způsob účinku rifampicinu a ostatních rifamycinů je spojen s inhibicí DNA-dependentní RNA polymerasy, kde dochází k vytvoření stabilního komplexu s tímto enzymem.^{8,9,11}

Použití:

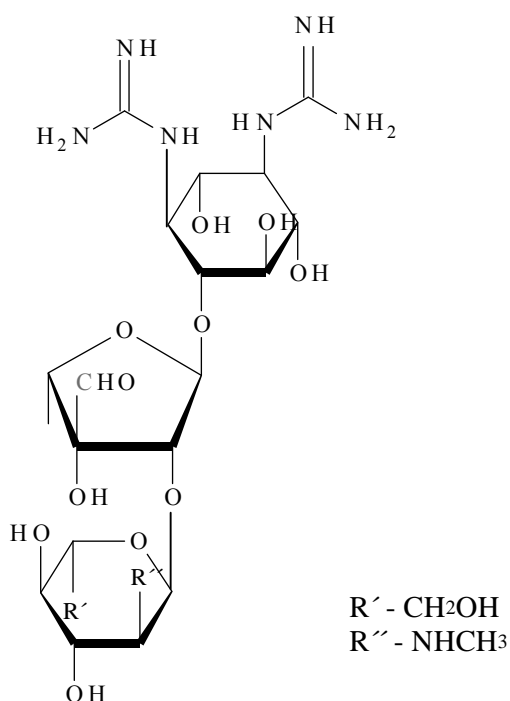
Rifampicin je klíčovou složkou moderní léčby TBC. Je indikován nejen k léčbě TBC, ale i dalších, především stafylokokových infekcí. Po perorálním podání se dobře absorbuje, lépe na lačno. Lze jej podávat i v graviditě.^{1,8,11}

Do skupiny rifamycinů patří také rifapentin a rifabutin. Hlavní výhodou rifapentinu je jeho 4-5× delší biologický poločas, který jej činí vhodnějším

k užití v intermitentní léčbě TBC. Další jeho výhodou je jeho akumulace uvnitř makrofágů, je až 60× vyšší než v extracelulární tekutině (kdežto rifampicin se takto akumuluje pouze pětinašobně).

Rifabutin je v současnosti indikován k prevenci *M. avium-complex* při pokročilé HIV infekci.^{11, 12}

Streptomycin



Charakteristika:

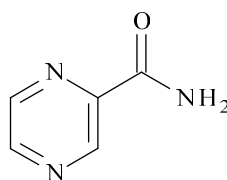
Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované z plísně *Streptomyces griseus*. Díky přítomnosti dvou silně bazických guanidinových skupin a slaběji bazické methylaminoskupiny je poměrně silná trojsytná báze. Používá se ve formě síranu. Působí baktericidně na extracelulárně uložená mykobakteria.

Mechanismus účinku je podobný účinku aminoglykosidů – jedná se o inhibici syntézy proteinů vazbou na ribozomální 30S podjednotku.^{4, 8, 9}

Použití:

Protože TBC je nejdůležitější indikací streptomycinu, je vhodné omezit jeho podávání při infekcích vyvolaných jinými mikroby pouze na ty případy, kdy léčba jiným antibiotikem není možná. Po perorální aplikaci se prakticky nevstřebává, podává se intramuskulárně. Antimikrobiální spektrum zahrnuje *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella spp.*, *Francisella tularensis* aj. Pro možnost rychlého rozvoje rezistence je používán převážně v kombinaci s dalšími antituberkulotiky.^{8,9,13}

Pyrazinamid



Charakteristika:

Pyrazinamid je syntetickým pyrazinovým analogem nikotinamidu, má baktericidní účinek pouze na intracelulárně fagocytovaná mykobakteria v kyselém prostředí. Jeho výjimečnou vlastností je tedy možnost zničení perzistorů a proto by měl být podáván především v prvních dvou měsících antituberkulotické léčby. U režimů takto prováděných dochází ke zkrácení celkové doby léčby.¹

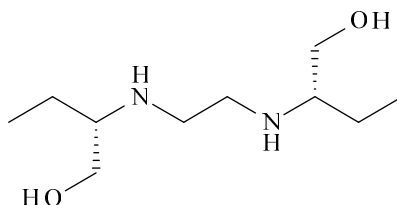
Mechanismus účinku spočívá v inhibici nikotinamidasy, jedná se o prekurzor vznikající uvnitř tuberkulotické buňky. Aktivním metabolitem je pyrazin-2-karboxylová kyselina.⁹

Použití:

Pyrazinamid je po perorálním podání velmi dobře absorbován z trávicího traktu. Je vhodný především k iniciální fázi terapie TBC (urychlení usmrcení replikujících a částečně nereplikujících kmenů *M. tuberculosis*) nebo při postižení CNS (pro velmi dobrý průnik), a to v kombinaci s isoniazidem a rifampicinem. Jeho indikací je terapie plicní i mimoplicní TBC (v kombinaci

s dalšími antituberkulotiky). Pyrazinamid je aktivní proti *M. tuberculosis*, *M. xenopi*, *M. avium*.^{8,9}

Ethambutol



Charakteristika:

Ethambutol je synteticky připravené antituberkulotikum s mykobakteriostatickým účinkem s velmi nízkou frekvencí nepříznivých vedlejších účinků podávané perorálně.¹

Jedná se o opticky aktivní sloučeninu typu aminoalkoholu se dvěma izolovanými chirálními atomy uhlíku. Účinný je pouze pravotočivý izomer.

Mechanismus účinku spočívá v polymerizaci arabinosy v buněčné stěně mykobakteria, místem jeho účinku je arabinofuranosyltransferasa, jež katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu nezbytného pro zachování integrity buněčné stěny.⁹

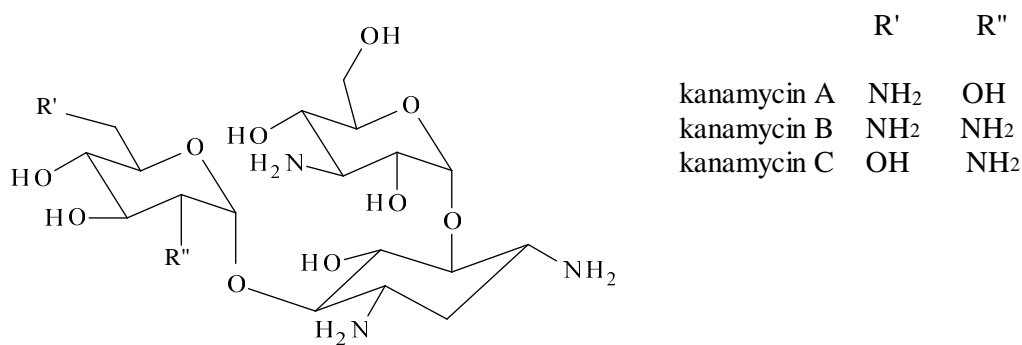
Použití:

Jeho použití je vhodné především v těch případech, kdy během terapie TBC kombinací isoniazid/rifampicin/pyrazinamid vznikla na jednu ze složek rezistence. Indikací je terapie plicní TBC (v kombinaci s dalšími antituberkulotiky), používá se k léčbě infekce vyvolané *M. avium* u pacientů se syndromem získané imunodeficiencie.⁹

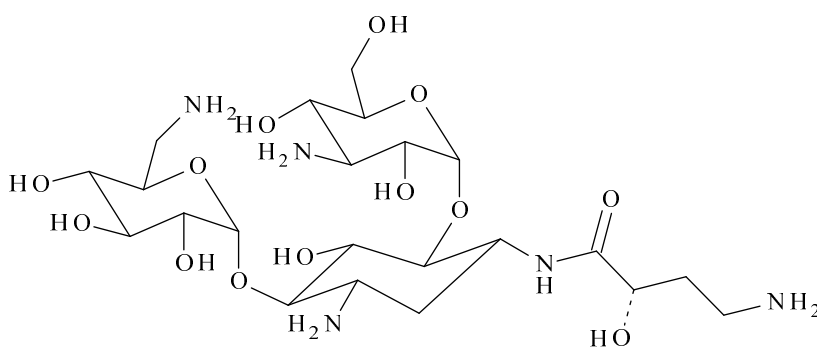
2.9.2 Antituberkulotika náhradní

Pokud nelze sestavit vhodný léčebný režim z antituberkulotik základních (věk nemocného, přidružené choroby, předchozí neúspěch léčby antituberkulotiky, rezistentní kmen), přistupujeme k podávání antituberkulotik vedlejších, tzv. druhé linie. Nyní, v období zvyšujícího se počtu polyrezistentních nemocných, opět nabývají na významu.^{1,4}

Kanamycin, amikacin



amikacin



Charakteristika:

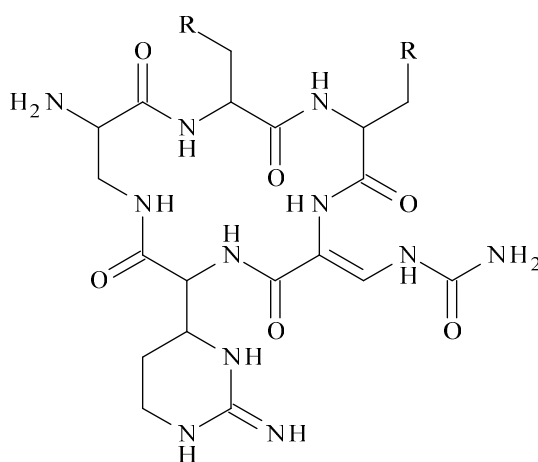
Jedná se o skupinu aminoglykosidových antibiotik s mykobaktericidním účinkem i vedlejšími projevy (ototoxicita, nefrotoxicita) stejnými jako streptomycin. Fyzikálně-chemicky jsou aminoglykosidy hydrofilní látky, které špatně pronikají biologickými membránami. Podávají se intramuskulárně.

Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin, která vzniká zásahem na různých místech ribosomu.^{1, 8}

Použití:

Tato antibiotika se řadí mezi náhradní antituberkulotika pro léčbu polyrezistentních nemocných. Amikacin je indikován i u mykobakterióz.⁴

Kapreomycin



Charakteristika:

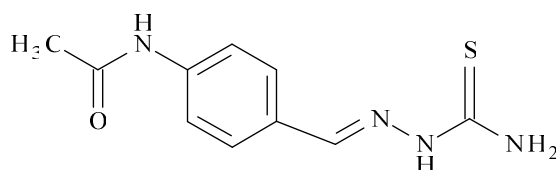
Toto antibiotikum bylo izolováno z kmene *Streptomyces capreolus*.

Jedná se o polypeptidové bakteriostatické antibiotikum působící na intracelulárně uložená mykobakteria.^{4, 13}

Použití:

Jeho antibakteriální účinek je zaměřen na *M. tuberculosis*, ale působí také na poměrně velký počet kmenů atypických bakterií. Má často zkříženou rezistenci s viomycinem, méně s neomycinem a kanamycinem. Po perorálním podání se nevstřebává z trávicího ústrojí, proto musí být podáván parenterálně. Klinicky se používá výhradně k léčbě TBC v kombinaci s jinými antituberkulotiky.^{5, 8}

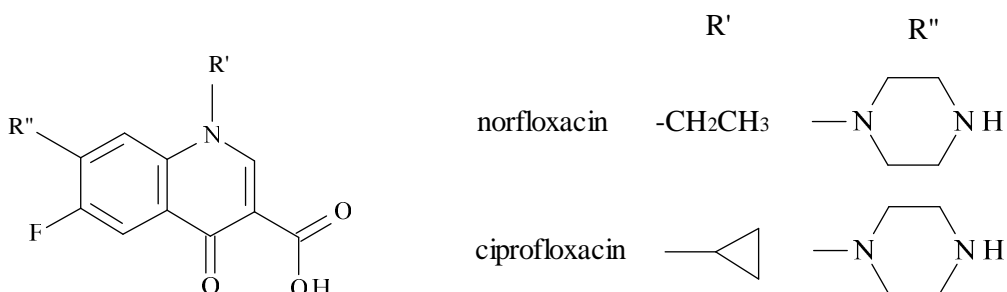
Thioacetazon



Charakteristika, použití:

4,4-diisooamylthiosemikarbanilid, má malou sterilizační schopnost. Své uplatnění jako základní antituberkulotikum má pouze pro rozvojové země v kombinaci s isoniazidem. V ekonomicky vyspělých zemích se nepoužívá. Účelem jeho aplikace je zabránit vzniku rezistence na isoniazid, při malých ekonomických nákladech. Léčebné výsledky ale nedosahují efektu klasických kombinací.⁴

Fluorochinolony



Ofloxacin a ciprofloxacin patří mezi chemoterapeutika s nízkou baktericidní aktivitou na mykobakteria. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin - jsou inhibitory dvou topoizomeras. Používají se v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Doporučují se také u mykobakterióz (např. *M. avium*).^{4, 8}

2.10 Potenciální antituberkulotika a jejich mechanismy účinku

2.10.1 Estery pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Byla připravena série esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny, u kterých byla zjišťována *in vitro* antimykobakteriální aktivita. Několik z nich mělo podstatně příznivější aktivitu než antituberkulotikum 1. linie pyrazinamid (PZA) proti citlivým kmenům *M. tuberculosis* stejně tak jako proti kmenům k pyrazinamidu rezistentním. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla pro všechny testované organismy stanovena nižší než v případě PZA. Estery byly aktivní proti *M. bovis* a *M. kansasii*, což jsou kmeny rezistentní vůči PZA, aktivita proti *M. avium* se neprojevila.

Mnoho nikotinamidových analogů, včetně pyrazinamidu, již bylo syntetizováno a testováno na antituberkulotickou aktivitu a pyrazinamid byl označen nejaktivnějším analogem. Ačkoli je *in vitro* aktivní proti většině izolovaných *M. tuberculosis* v koncentracích nižších než 50 µg/ml, má úzké spektrum účinku. *M. bovis* a netuberkulózní mykobakterie jsou obvykle rezistentní. Další zajímavou vlastností této látky je nutnost zachování nízkých hodnot pH pro jeho aktivitu.

Ačkoli mechanismus rezistence PZA není spolehlivě určen, bylo zpozorováno, že souvisí s nízkou aktivitou enzymu nikotinamidasy, který přeměňuje nikotinamid na kyselinu nikotinovou. Předpokládá se, že PZA je pomocí této amidasy přeměněn na kyselinu pyrazin-2-karboxylovou, která je vlastní účinnou látkou uvnitř buněk. Estery této kyseliny mohou tak sloužit jako proléčiva – jsou totiž hydrolyzovány jinými enzymy než je amidasa.

Některé z připravených esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny měly *in vitro* lepší aktivitu vůči *M. tuberculosis* než pyrazinamid, některé byly dokonce aktivní i proti pyrazinamid-resistentním *M. tuberculosis*. *In vitro* aktivity těchto esterů byla nejvyšší při pH 5,8. Zásadní je fakt, že MIC esterů byla vždy nižší pro všechny testované organismy a všechny pH v porovnání s pyrazinamidem.¹⁴

2.10.2 Substituované estery pyrazin-2-karboxylové kyseliny

Byla připravena série substituovaných esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny a tyto byly podrobeny *in vitro* testování aktivity proti *M. avium*, *M. kansasii* a *M. tuberculosis*. Modifikace jak na pyrazinovém jádře, tak na esterové funkční skupině byly velmi úspěšné ve smyslu rozšíření aktivity na *M. avium* a *M. kansasii*, což jsou mykobakterie necitlivé k PZA. Několik z těchto sloučenin bylo dokonce 100–1000× účinnější vůči *M. tuberculosis* než pyrazinamid.

Halogenace chlorem v poloze 5 zvýšila *in vitro* aktivitu proti *M. tuberculosis*. *In vitro* aktivita oktylesteru, *n*-oktylesteru a *n*-propylesteru 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny vykazovala významnou účinnost (viz tabulka)

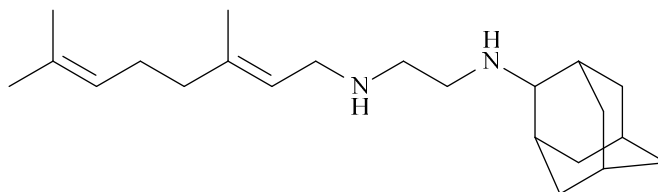
Tabulka č. 3: Minimální inhibiční koncentrace substituovaných esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny měřené proti různým mykobakteriálním kmenům¹⁵

MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	<i>M. avium complex</i>		<i>M. kansasii</i>	<i>M. tuberculosis</i>		
	101	ATCC 49601	S	ATCC 35801	ATCC 27294	ATCC 35828
pyrazinamid	>2048	>2048	2048	32	16	2048
Estery 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny:						
Methyl	256	64	2	8	4	16
Ethyl	128	128	2	2	1	>16
n-propyl	16	16	0,25	$\leq 0,03$	0,06	0,25
n-butyl	64	128	≤ 1	0,5	0,25	0,5
n-pentyl	32	32	$\leq 0,03$	0,25	0,06	0,12
n-hexyl	32	16	0,015	0,125	0,125	0,5
n-heptyl	8	16	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	0,06	$\leq 0,03$

n-oktyl	16	16	≤0,03	≤0,03	0,06	≤0,03
n-nonyl	32	16	≤0,125	1	≤0,03	≤0,03
n-decyl	32	16	0,5	0,25	0,5	0,5
n-undecyl	16	8	0,06	0,5	0,25	0,5
Allyl	64	64	≤1	1	1	2
Isobutyl	64	64	≤1	0,25	2	2
terc-butyl	128	128	≤1	0,5	2	4
Benzyl	8	4	1	0,5	1	1
2'-heptyl	32	32	≤0,125	0,5	0,06	0,06
2'-oktyl	8	16	≤0,015	0,25	0,06	0,5

Substituce fluorem či methylovou skupinou v poloze 5 vykazovala nižší aktivitu v porovnání s chlorovanými deriváty. Připravené substituované estery jsou však mnohem labilnější než amidová proléčiva. Stabilitní studie v séru ukázaly, že labilita souvisí s esterovým řetězcem. Je možné předpokládat, že vhodnou manipulací s alkoholovým zbytkem by *in vivo* stabilita mohla být zvýšena.¹⁵

2.10.3 SQ-109



Charakteristika:

Syntéza a podrobné zkoumání dvoudusíkatých analogů ethambutolu přineslo řadu sloučenin s aktivitou proti *M. tuberculosis* stejnou nebo lepší než v případě ethambutolu. Sloučenina SQ-109 obsahující nenasycené isoprenylové jednotky a rozměrný adamantanový kruh byla vybrána po *in vitro* a *in vivo* testování jako nejnadějnější.

SQ-109 vykazuje výbornou *in vitro* aktivitu proti *M. tuberculosis* zahrnující druhy rezistentní k ethambutolu, isoniazidu a rifampicinu. Tato látka nabízí limitovanou biodostupnost, na druhou stranu ale disponuje velkým distribučním objemem v různých tkáních, zvláště pak v plicích. S největší pravděpodobností je SQ-109 pouze proléčivem účinné látky.

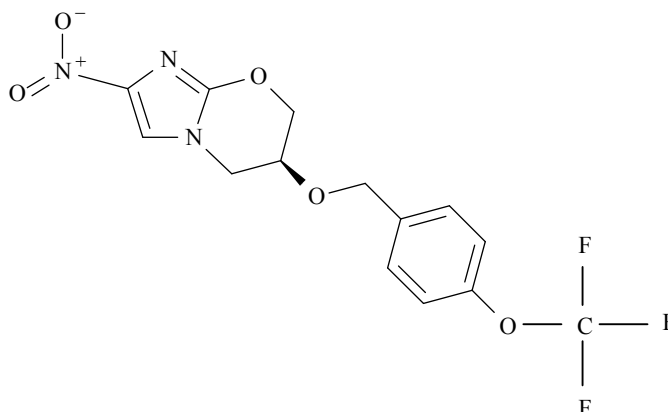
Mechanismus účinku:

Přesný mechanismus účinku není znám. Existuje však domněnka, že tato látka ovlivňuje syntézu buněčné stěny mykobakterií odlišným způsobem než ethambutol. Navíc je účinná i proti ethambutol-rezistentním kmenům.

Terapie:

Kombinované podávání SQ-109 a rifampicinu nebo isoniazidu jeví synergismus v *in vitro* aktivitě a v kombinaci s dalšími antituberkulotiky 1. linie nedochází k antagonismu v účinku. Zvláště účinná je kombinace SQ-109 a rifampicinu, kde dochází k inhibici růstu *M. tuberculosis* o více než 99 % už při velmi nízkých koncentracích. Tato kombinace je také efektivní vůči rifampicin-rezistentním druhům.¹⁶

2.10.4 PA-824



Charakteristika:

Bicycklické nitroimidazofurany byly objeveny jakožto aktivní sloučeniny účinné proti *M. tuberculosis*. Původně objevená sloučenina se však ukázala být mutagenní. U strukturou příbuzných bicycklických nitroimidazo[2,1-b]oxazinů byla nalezena stejná aktivita, ale postrádají nežádoucí mutagenní vlastnosti.

PA-824 představuje látku s vysokou *in vitro* aktivitou proti *M. tuberculosis* zahrnující také druhy na jiná antituberkulotika rezistentní. Co je důležité, tato látka nevykazuje zkříženou rezistenci s žádným ze současných antituberkulotik 1. linie a je účinná *in vitro* proti nereplikující se fázi *M. tuberculosis* (léčba latentní formy TBC). Sloučenina také vykazuje značnou *in vivo* aktivitu proti perzistujícím mykobakteriím, které se nepodařilo zdolat dvouměsíční intenzivní léčbou zahrnující rifampicin, isoniazid a pyrazinamid.

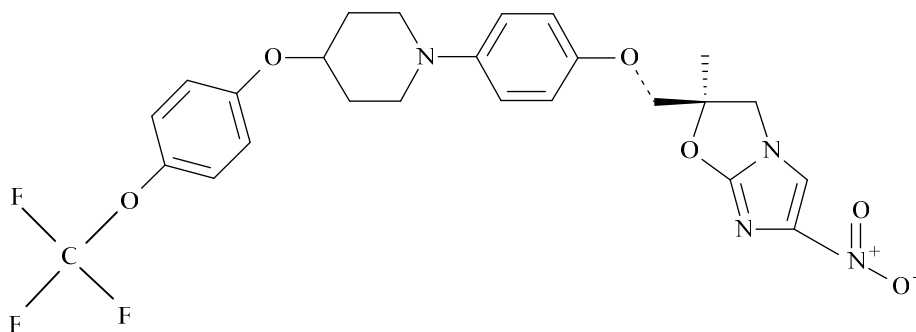
Mechanismus účinku:

Mechanismus účinku této látky je dvojitý – inhibuje syntézu lipidů a proteinů buněčné stěny *M. tuberculosis*. Vzhledem k tomu, že tato látka je také aktivní proti nereplikující se *M. tuberculosis*, je pravděpodobné, že inhibice syntézy buněčné stěny nebude jediným mechanismem účinku. PA-824 je ve skutečnosti proléčivo, které je metabolizováno *M. tuberculosis* dříve než dojde k samotnému účinku. Tato přeměna může pravděpodobně zahrnovat redukci aromatické nitroskupiny na reaktivní anion jako meziprodukt.

Terapie:

Nahrazení isoniazidu touto sloučeninou při standardním léčebném režimu vede k efektivnější léčbě u myši jako *in vivo* modelů. Substituce rifampicinu nebo pyrazinamidu se zdá být vzhledem k aktivitě nevýhodná. Navíc byl sledován vyšší počet relapsů po šestiměsíční terapii rifampicinem, isoniazidem a PA-824. Toto je důkazem nízké sterilizační aktivity. Kombinace PA-824 a isoniazidu nevykazuje žádný synergismus, ale je schopna zabránit vzniku kmenů rezistentních na tuto látku či na isoniazid. PA-824 má dlouhý biologický poločas a zdá se, že se hromadí v těle, ačkoliv neexistuje dostatek důkazů co se týče metabolismu této látky, které by pomohly vysvětlit tyto farmakokinetické vlastnosti. V současné době PA-824 prochází 2. fází klinického zkoušení.¹⁶

2.10.5 OPC-67683



Charakteristika:

Syntéza a zkoušení série sloučenin se strukturou 6-nitro-2,3-dihydroimidazo [2,1-b]oxazolu vedly k objevení této látky. OPC-67683 vykazuje výbornou aktivitu proti citlivým kmenům a kmenům rezistentním, nebyla prokázána zkřížená rezistence se žádným ze současných antituberkulotik 1. linie. Dlouhý biologický poločas, absence metabolizace na cytochromu P 450 a jeho účinnost u imunodeficitních myši nasvědčuje tomu, že tato látka by mohla být vhodná pro léčbu pacientů trpících HIV/TBC.

Mechanismus účinku:

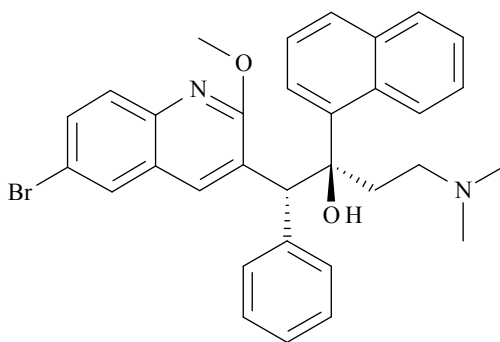
Jedinečná struktura buněčné stěny mykobakterií bohatá na kyselinu mykolovou je cílem účinku této látky, která inhibuje syntézu analogů mykolové kyseliny (podobně jako u isoniazidu, ale v jednoznačně nižších koncentracích). Narozdíl od isoniazidu neinhibuje biosyntézu α -mykolové kyseliny. Zatím není známo, zda OPC-67683 působí na syntézu bílkovin anebo zda interaguje s jinými strukturami *M. tuberculosis*. Jako v případě předchozí nadějně sloučeniny PA-824 je také tato látka proléčivem. Po metabolizaci uvnitř buňky vzniká jeden hlavní metabolit – desnitro-imidazooxazol. OPC-67683 rezistentní druhy *M. tuberculosis* nejsou schopny přeměňovat tuto látku na aktivní formu.

Terapie:

Kombinace této sloučeniny s antituberkulotiky 1. linie rifampicinem, isoniazidem, ethambutolem a streptomycinem nevykazuje žádné antagonistické působení, zatímco synergismus se objevuje s rifampicinem nebo ethambutolem *in vitro*. Kombinace s rifampicinem a pyrazinamidem po dobu dvou měsíců, na niž navazuje terapie v kombinaci s rifampicinem po následující další dva měsíce prakticky eliminuje všechny plicní mykobakteriální ložiska během tří měsíců, po čtyřech měsících dochází k celkové eliminaci (posuzováno u myších modelů).

Toto nasvědčuje tomu, že OPC-67683 má silné sterilizační účinky a mohlo by sloužit ke zkrácení celkové délky terapie. Látka úspěšně prošla 2. fází klinického zkoumání.¹⁶

2.10.6 TMC-207



Charakteristika:

Skupina diarylchinolinů byla objevena jako účinná *in vitro* proti *M. tuberculosis*. Následné testování *in vivo* aktivity ukázalo, že nejvyšší účinek z těch vzájemně si velmi podobných molekul má právě TMC-207. Tato sloučenina vykazuje výbornou aktivitu proti citlivým kmenům, MDR (multirezistentním) a XDR (mnohočetně lékově rezistentním) kmenům, bez zkřížené rezistence na současná antituberkulotika 1. linie. Zdá se, že tato látka má větší účinnost proti zmutovaným kmenům *M. tuberculosis* než proti citlivým izolovaným kmenům. Některé kmeny jsou tedy vůči TMC-207 rezistentní, zůstávají však plně citlivé na ostatní antituberkulotika.

Použití této sloučeniny samotné se jeví být přinejmenším stejně tak efektivní jako kombinace rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu a více efektivní než rifampicin samotný. TMC-207 vykazuje silnou sterilizační účinnost na morčatech, zdá se být 100× více efektivní než tradiční kombinace rifampicin-isoniazid-pyrazinamid. Byla prokázána dobrá absorpce po p.o. podání u člověka s dlouhým biologickým poločasem.

Mechanismus účinku:

TMC-207 působí inhibičně na ATP-syntasu mykobakterií. Tento jedinečný mechanismus účinku poskytuje velké možnosti – je zde jistá podobnost mezi lidským a mykobakteriálním genem pro kódování určité podjednotky ATP-syntasy, která je specifickým cílem této sloučeniny.

Terapie:

Kombinace TMC-207 se současnými antituberkulotiky 1. linie měla za následek negativní nález u myších modelů a to po dvouměsíční léčbě. Kromě toho byl pozorován synergistický efekt u kombinace s pyrazinamidem, kde terapie trvající dva měsíce vedla ke kompletní eliminaci *M. tuberculosis* v plicní tkáni. 2. fáze klinického zkoumání ukázala, že látka je pacienty dobře snášena, má přiměřenou aktivitu proti *M. tuberculosis*, ačkoli je nižší než u rifampicinu nebo isoniazidu v monoterapii. Studie dlouhodobé bezpečnosti a účinnosti u MDR *M. tuberculosis* případů probíhají od poloviny roku 2007.¹⁶

2.10.7 Ostatní potenciální antituberkulotika

Řada dalších sloučenin prochází klinickými a preklinickými testy. Jednou z těchto látek je **LL-3858**, analog isoniazidu. Další zajímavou látkou je **OPC-37306**, která byla objevena při screeningových studiích zkoumajících inhibici biosyntézy kyseliny mykolové. Tato látka je aktivní proti citlivým i rezistentním *M. tuberculosis* kmenům a jeví se účinnější než rifampicin u myších modelů.

Sloučenina **FAS-20013** je další látkou, která prochází klinickými zkouškami a zdá se, že by mohla eliminovat více než 99 % mykobakterií (včetně latentních stádií TBC) během 24 hodin. Doposud nebyly stanoveny kmeny rezistentní k této látce, navíc má dobrý farmakokinetický profil. Dalšími slibnými sloučeninami jsou **SQ-609** a **SQ-641**, které jsou prozatím v preklinické fázi hodnocení.¹⁶

2.10.8 Závěr

OPC-67683 a TMC-207 jsou nejslibnějšími zástupci nové generace antituberkulotik, obě látky jsou vysoce aktivní proti citlivým i rezistentním kmenům a vykazují vynikající sterilizační účinek. Kromě toho, OPC-67683 by mohla být účinná u HIV/TBC pacientů, zatímco TMC-207 by mohla být efektivní proti XDR *M. tuberculosis* díky mimořádnému synergismu s pyrazinamidem.

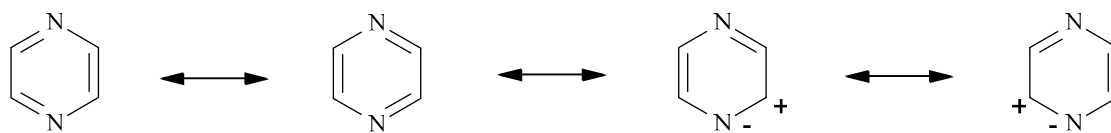
Tyto a další objevy v léčbě TBC přinášejí naději, že během následujícího desetiletí může být dosaženo efektivní terapie TBC s kratší dobou léčby.¹⁶

3 Teoretická část

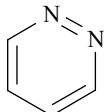
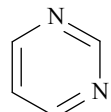
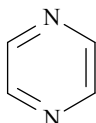
3.1 Chemické vlastnosti pyrazinového jádra

Pyrazin, chemicky pojmenovaný 1,4-diazin, je slabě aromatická sloučenina vlastnostmi podobná terciárních alifatickým aminům. Jedná se o vysoce symetrickou heterocyklickou strukturu.

Pyrazinové jádro lze jako planární útvar znázornit více způsoby, existují zde rezonanční hybridní uspořádání¹⁹



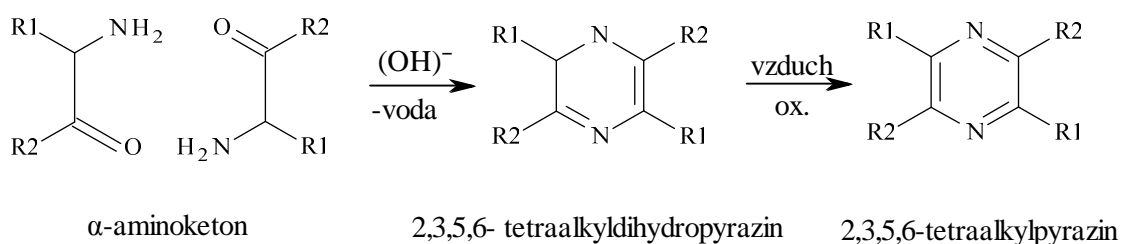
Pro ukázkou je zde předloženo srovnání vlastností s jinými diaziny:

pyridazin	pyrimidin	pyrazin
		
b.v. 205 °C b.t. - 8 °C pKa 2,3	b.v. 124 °C b.t. 21 °C pKa 1,3	b.v. 115 °C b.t. 21 °C pKa 0,6

U diazinů hodnota bodu varu (b.v.) postupně klesá od pyridazinu k pyrazinu, naopak bod tání (b.t.) v uvedeném pořadí stoupá. Pyrazin, jako struktura s největší symetrií, má stanoven nejvyšší bod tání. Hodnoty pKa určují bazicitu, z čehož vyplývá, že pyraziny jsou neslabší báze.²⁰

Dva terciární atomy dusíku v kruhu působí indukčním efektem a vyvolávají tak kladné náboje na uhlíkových atomech heterocyklu. Díky tomuto ději zde nenastává elektrofilní substituce. Reakce vynucená drastickými podmínkami vede k přednostnímu otevření kruhu. Výhodnější jsou z tohoto důvodu substituce nukleofilní.^{19,21}

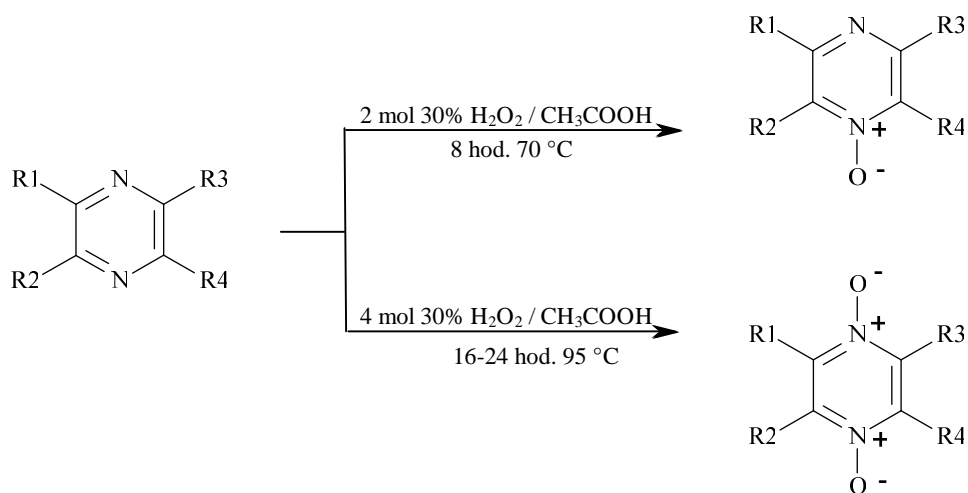
Sloučeniny s pyrazinovým kruhem se připravují autokondenzací α -aminoaldehydů nebo α -aminoketonů:²⁰



3.2 Příprava *N*-oxidů pyrazinu

N-oxidy pyrazinu jsou obvykle připravovány přímou oxidací. Běžným postupem je přidání peroxidu vodíku o různé koncentraci (30-85 % w/w) do roztoku pyrazinu v kyselině octové. Jinou metodou je provedení oxidace v prostředí kyseliny mravenčí nebo kyseliny trifluoroctové.

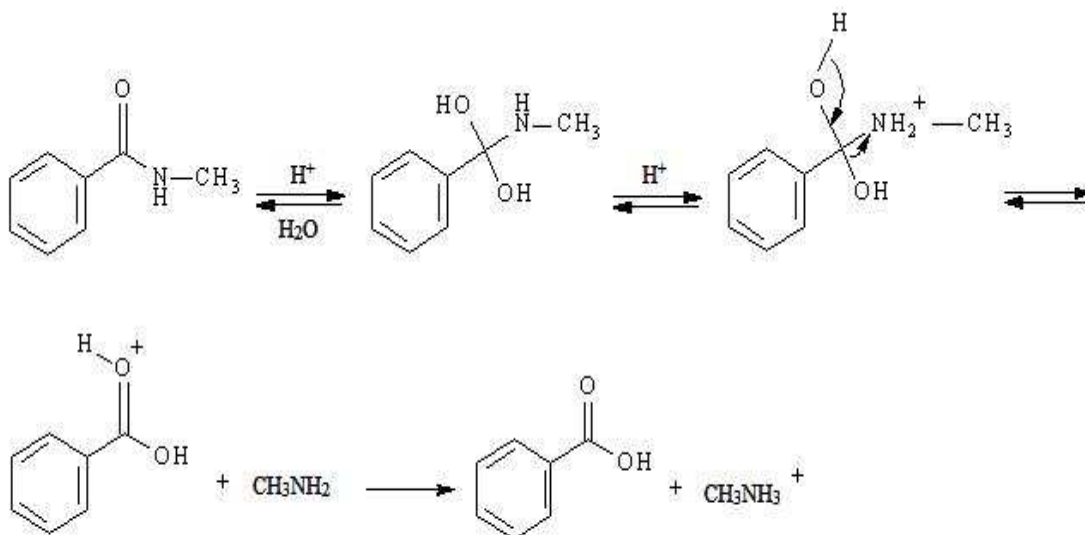
Požadovaným produktem oxidace při nižší teplotě je u monosubstituovaných pyrazinů monooxid, který vzniká oxidací atomu dusíku vzdálenějšího od substituenta. 1,4-dioxidy jsou získávány delším zahříváním při vyšších teplotách.²²



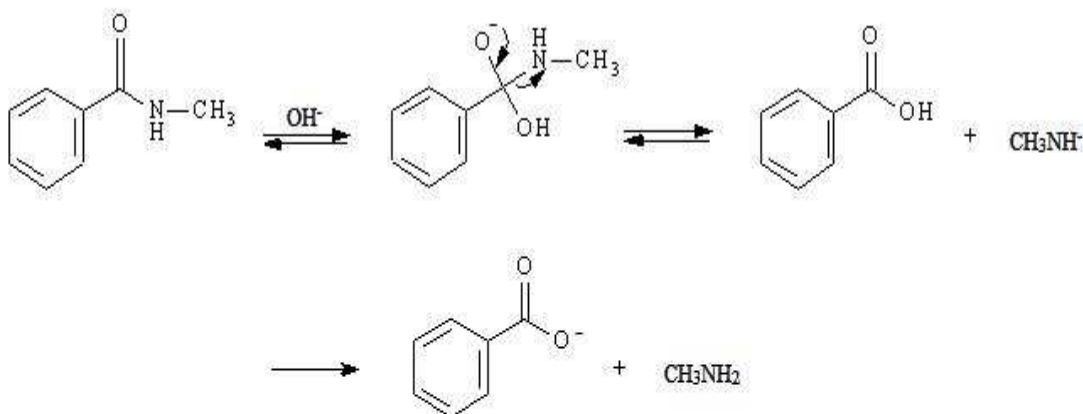
3.3 Příprava karboxylové kyseliny z amidu kyseliny

Amidy karboxylových kyselin se řadí mezi funkční deriváty s nejnižší reaktivitou. Hydrolyza amidů může být uskutečněna jak za podmínek kysele, tak bazicky katalyzované reakce.

Při kyselé katalyzované reakci se v posledním stupni uvolněný amoniak nebo amin protonizuje, čímž dojde k nevratnému odstranění nukleofilního činidla z reakční rovnováhy.



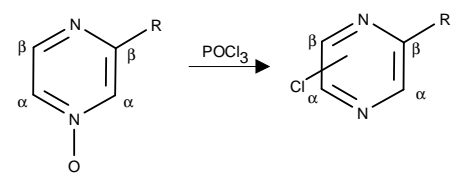
Bazicky katalyzovanou reakcí vzniká karboxylátový anion neschopný nukleofilního ataku amoniakem či aminem.²³



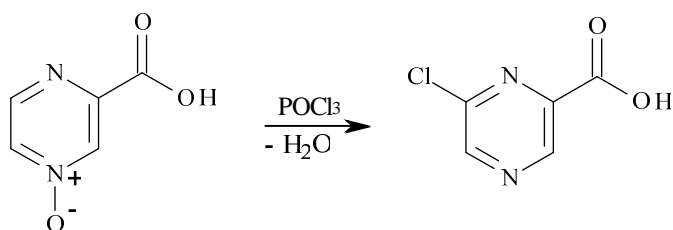
3.4 Halogenace pyrazinu

Halogenaci pyrazinového jádra lze provést třemi klasickými způsoby. Méně užívanými metodami jsou jednak přímá halogenace pyrazinu v plynné fázi, dalším způsobem pak záměna hydroxyskupiny nebo aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejpoužívanější metodou je však nukleofilní halogenace *N*-oxidů pyrazinu. Výsledek chlorace pyrazin-4-oxidů závisí kromě reakční doby na charakteru substituentů. Substituenty s negativním mezomerním efektem v poloze 2 určují vznik 6-chlor derivátů. Za současné deoxygenace tak vznikají 2,6-disubstituované pyraziny. Substituenty s pozitivním mezomerním efektem v poloze 2 řídí vstup chloru do polohy 3 a vznikají tak 2,3-disubstituované pyraziny. Kromě námi požadovaného produktu 2,6-disubstituovaného pyrazinu současně vzniká také různé procento 2,3- a 2,5-disubstituovaných derivátů (viz tabulka na další straně).

Tabulka č. 4: Výsledky chlorace pyrazin-4-oxidu

		polohy atomu chloru a zastoupení izomerů ve směsi chlorderivátů v %		
		α		β
R	výtěžek chlorace v %	3	5	6
-NH ₂	51	99	1	-
-OCH ₃	79	44	4	52
-Cl	76	55	5	43
-C ₆ H ₅	96	43	8	49
-CONH₂	88	22	22	56
-COOCH ₃	91	5	5	90
-CN	52	36	24	40

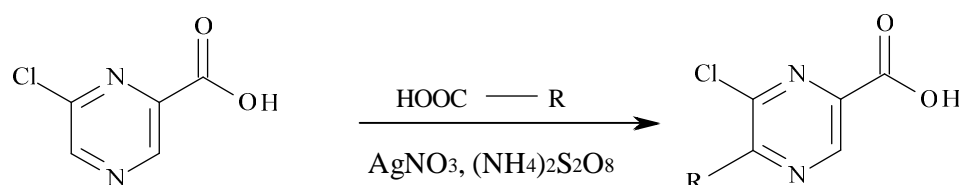
V případě chlorace 4-oxidu-2-pyrazinkarboxylové kyseliny je chemická reakce prováděna za stejných reakčních podmínek jako chlorace 4-oxidu-2-pyrazinkarboxamidu (v uvedené tabulce tučně). Reakce je však prováděna při nižších teplotách a po kratší dobu.^{24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33}



3.5 Homolytická alkylace

Radikálovou alkylací příslušnou alkanovou kyselinou lze využít k zavedení alkyly na pyrazinové jádro. Alkylradikály zde vznikají Minisciho reakcí za přítomnosti redoxního systému, který je tvořen dusičnanem stříbrným a peroxidisíranem amonným.

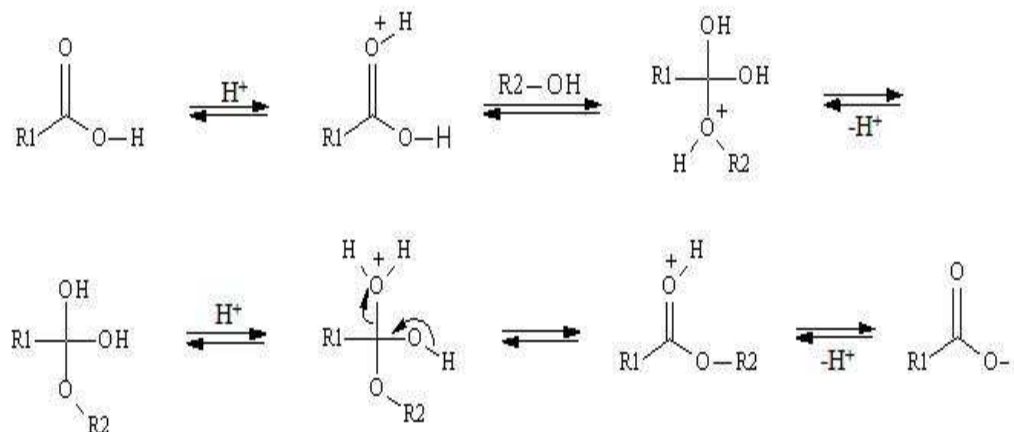
Monoalkylace je dosaženo tím, že po navázání první alkylové skupiny je pyrazinové jádro deaktivováno. Takto už nemůže dojít k dalšímu nukleofilnímu útoku.³⁴



3.6 Esterifikace

Fischerova esterifikace je reakce karboxylové kyseliny s alkoholem při níž vzniká ester dané karboxylové kyseliny. Esterifikace musí být katalyzována minerální nebo Lewisovou kyselinou, neboť alkoholy jsou pouze slabě nukleofilní a karboxylová skupina nedostatečně elektrofilní.

Nejprve dochází k protonizaci karboxylové skupiny, která poté aduje alkohol. Po odštěpení protonu opět vzniká tetrahedrální intermediát. Protonizací jedné z hydroxylových skupin dochází k tvorbě oxoniového iontu, který se eliminuje ve formě vody. Ztráta protonu z druhé hydroxylové funkce dává vzniknout neutrálnímu esteru.²³



3.7 Flash chromatografie

Jedná se o rychlou formu separační sloupcové chromatografie založené na využití optimalizované předem předplněné kolony, přes kterou je čerpána mobilní fáze vysokou průtokovou rychlostí. Je to jednoduchý, rychlý a ekonomický přístup k separaci organických látek. Byla vyvinuta v roce 1978 na Columbijské univerzitě a nyní je populární metodou čištění a separace látek pomocí přímé stacionární fáze. Stále více je také využíváno reverzních stacionárních fází, což poskytuje větší variabilitu.

Flash chromatografie využívá plastové kolony naplněné pevnou stacionární fází, obvykle silikagelem (oxid křemičitý). Vzorek je pak umístován nad vrstvu silikagelu. Zbytek sloupce je naplněn mobilní fází a s pomocí tlaku je umožněno projítí vzorku kolonou a zajištění jeho separace. Dříve byl používán pouhý tlak vzduchu, dnes je proces urychlován pomocí čerpadel. Tato technika využívá pro oddělení látek nízkých až středně vysokých tlaků a s její pomocí je možno separovat od několika miligramů až po desítky až stovky gramů. Nejčastěji je stacionární fází oxid křemičitý používaný s nepolárními rozpouštědly. Průtoková rychlost se pohybuje mezi 10ml/min až 300ml/min. Stále více jsou ale využívány reverzní stacionární fáze společně s polárními rozpouštědly. Způsobů využití flash chromatografie je mnoho, jedná se jak o objevování nových léčiv, tak o čištění vzorků či přírodních produktů a mnoho dalších.

Shrnutí:

Systém flash chromatografie je moderní proces separace, skleněné kolony jsou nahrazeny předplněnými plastovými zásobníky, které jsou mnohem bezpečnější a také lépe reprodukovatelné. Mobilní fáze je čerpána přes zásobník, což je mnohem rychlejší a je omezen přímý kontakt s organickým rozpouštědlem. Systémy mohou být rovněž spojeny s detektory a jímači frakcí pracujícími automaticky. Zavedení čerpadel s možností vytváření gradientu znamená rychlejší separaci, použití méně rozpouštědla a větší flexibilitu.¹⁷

3.8 Mikrovlnné záření

▪ Teorie

Mikrovlny jsou vysokofrekvenční elektromagnetické záření s frekvencí v intervalu 30–0,3 GHz, těmto hodnotám odpovídá vlnová délka 0,01–1 m. Mikrovlny o vlnové délce 12 cm (2,45 GHz) mají frekvenci blízkou rezonanční frekvenci některých nesymetrických molekul, hlavně vody. Molekula vody má charakteristický tvar daný atomem kyslíku a dvěma atomy vodíku, které dohromady svírají úhel přibližně 105 °. Toto uspořádání způsobuje, že molekula vody vytváří tzv. dipól. Kladné náboje jader a záporné náboje elektronových obalů nejsou v molekule vody rozmístěny zcela symetricky, což znamená, že molekula se navenek jeví na jedné straně nabitá víc kladně a na druhé záporně. Mikrovlny produkované např. mikrovlnou troubou tvoří elektromagnetické vlnění, které působí na nabitě předměty, v našem případě na molekuly vody. Mikrovlny velmi rychle mění polaritu elektromagnetického pole v daném místě, podobně jako rozkmitaná struna mění svoji polohu nahoru a dolů. Takové oscilující pole působí na dipóly vody, rozkmitává je a dodává jim tak energii. Tato energie se projeví například rozrušováním chemických vazeb v řetězcích molekul navázaných k sobě a zvyšováním pohybové energie molekul. Navenek poté pozorujeme tento zvýšený pohyb molekul jako růst teploty.

Důležité je, že frekvence mikrovln (asi 2,45 GHz) je stejná jako vlastní frekvence kmitání dipólů vody. Dochází zde tedy k jevu rezonance. Mikrovlny tedy díky rezonanci nejlépe rozkmitají právě molekuly vody, na jiné molekuly pole příliš nepůsobí.¹⁸

▪ Interakce s chemickými částicemi

Podstata účinku mikrovlnného záření je v jeho interakci s polárními látkami. Tyto látky (např. molekuly vody) se snaží orientovat ve směru záření, ale elektrické pole mění při uvedené frekvenci svůj směr $2,45 \times 10^9$ krát za sekundu, polární molekuly se snaží tyto změny sledovat, tj. pokaždé změnit orientaci, dochází k jejich vibraci až rotaci ve směru pole. Při vysoké rychlosti oscilace pole nestačí molekuly tyto změny zcela sledovat a výsledkem pohybu a vzájemného „tření“ je přeměna mikrovlnné energie na teplo.

Kapaliny, které nemají dipólový moment nebo v nich nemůže být indukován, nejsou přímo ohřívány mikrovlnami. Po přidání malého množství polární kapaliny k mísitelné nepolární kapalině dojde k vytvoření směsi, která rychle dosáhne jednotné teploty po ozáření mikrovlnami. Pro látky obsahující ionty je nejefektivnější mechanismus ohřevu migrace iontů doprovázená jejich srážkami. Ionty se mohou roztokem pohybovat vlivem působení elektrického pole, kinetická energie provázející srážky molekul je přeměňována v teplo.

Důležitým aspektem je tepelná kapacita látek. Například propan-1-ol má dipólový moment 20,1 D, voda má dipólový moment 78,54 D, avšak propan-1-ol se ohřívá v mikrovlnné troubě 1,7× rychleji. Příčinou je tepelná kapacita propan-1-olu, která je podstatně nižší než vody.¹⁸

Obrázek č. 3: Dipolární molekuly snažící se přizpůsobit oscilujícímu elektrickému poli



Obrázek č. 4: Nabité částice v roztoku následující působící elektrické pole



▪ **Využití mikrovln**

Využití mikrovln při chemických reakcích může vést ke zlepšení selektivity reakce, k produkci většího výtěžku a také ke zkrácení reakčního času. Dále dochází ke zlepšení při rovnovážných reakcích, kdy je rovnováha posunuta odpařením malé molekuly z reakční směsi.

Reakce probíhají v uzavřených, průtokových nebo otevřených reaktorech. Uzavřené reaktory bývají z teflonu, vše je plně uzavřeno v tomto teflonovém kontejneru s čidly pro kontrolu teploty a tlaku. V otevřených reaktorech je možno pracovat s běžným laboratorním sklem, kdy reakční baňka je napojena na chladič. Ozařuje se celý prostor uvnitř zařízení. V průtokových reaktorech prochází ozařovaný vzorek ze zásobníku kolonou, kde je ozáren, poté pokračuje do jímače.¹⁸

▪ **Výhody a aplikace mikrovln**

V posledních letech se stále více setkáváme s použitím mikrovln v organické syntéze. Reakce při ozařování mikrovlnným zářením probíhají extrémně rychle (obvykle jsou kompletní během několika minut) a vyžadují poměrně jednoduché zařízení tj. modifikované mikrovlnné trouby pro laboratorní účely.

Využívání mikrovln v laboratořích má mnohé výhody. Syntézy probíhají ve velmi krátkém čase (několik minut), je tak umožněn rychlý „screening“ molekul. Reprodukovatelnost výsledků je zajištěna přiměřenou teplotní homogenitou, vynikajícím přenosem energie a dobrou čistotou produktů. Metoda přináší vyšší výtěžky reakcí, k úspoře nákladů přispívá používání malých objemů rozpouštědel či jejich úplné vynechání. Důležitým aspektem je také bezpečnost – syntézy probíhají za normálního atmosférického tlaku, celý proces je dokonale monitorován.

Chemie mikrovln má do budoucna velký význam. Reakce v mikrovlnách nezatěžují tolik životní prostředí jako klasické syntézy v laboratořích. Jsou ekonomicky velmi výhodné např. není potřeba užití rozpouštědla atd. Přinášejí také zlepšení a zjednodušení syntéz naproti běžně zavedeným metodám (vodní či olejové lázně).¹⁸

4 Experimentální část

4.1 Přístrojové vybavení a chemikálie

U použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty, rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna obvyklým způsobem.

Syntéza esterů z výchozí kyseliny a příslušného alkoholu byla prováděna v mikrovlnném reaktoru CEM Explorer – 24 position, CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA.

K odpařování rozpouštědel jsme používali vakuovou odparku značky Heidolph.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s použitím aktivního uhlí a za použití flash-chromatografie na přístroji CombiFlash® Rf, Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA.

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie s použitím desek Merck, Silica gel 60 F₂₅₄. V případě stanovení derivátů karboxylové kyseliny byla použita vyvíjecí soustava propanol – amoniak aq (3:1), v případě stanovení esterů byla využita vyvíjecí soustava hexan – ethyl-acetát (1:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Teploty tání byly stanoveny v kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP3, Bibby Sterling LTD, UK a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla naměřena pomocí FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Nicolet - Thermo Scientific, USA) v chloroformu, měření provedla p. Iva Vencovská z KAOCH FaF UK.

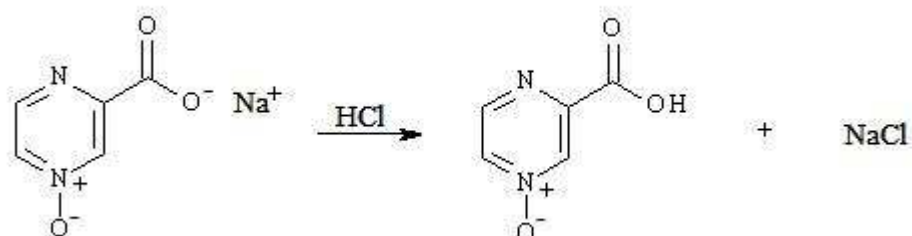
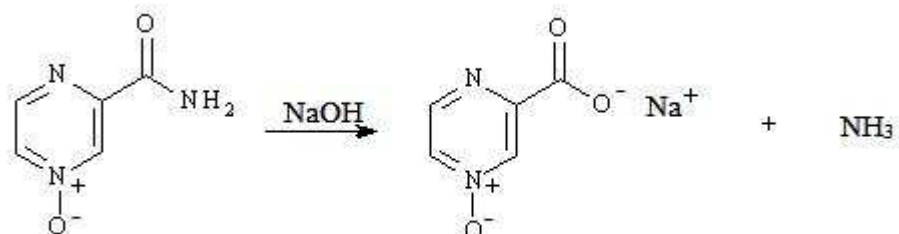
¹H NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pro ¹H a 75,43 MHz pro ¹³C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, Csc. z KAOCH FaF UK. Chemické postupy jsou vztaženy k Si(CH₃)₄.

Log *P* sloučenin byl vypočten programem CS ChemBioOffice Ultra, verze 11.0 (CambridgeSoft. Cambridge, MA, USA).

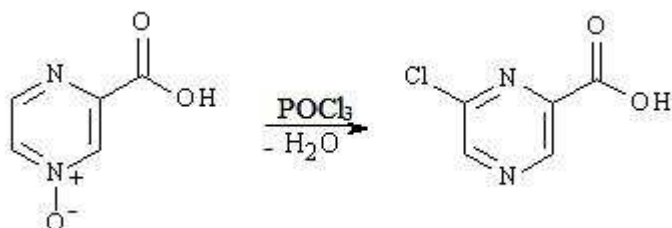
4.2 Schéma prováděných reakcí

4.2.1 Příprava výchozí kyseliny

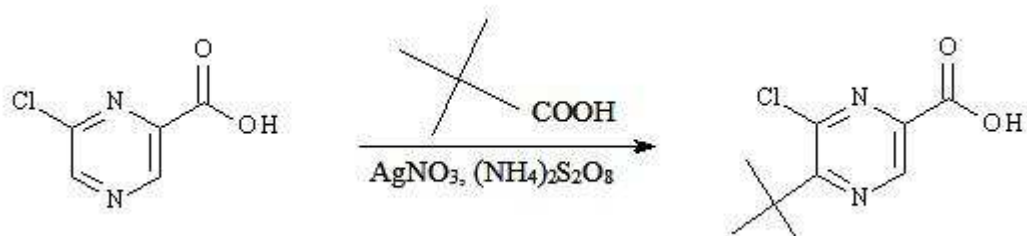
1.krok:



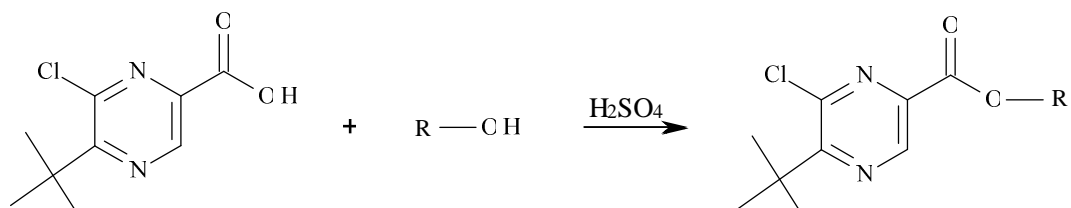
2.krok:



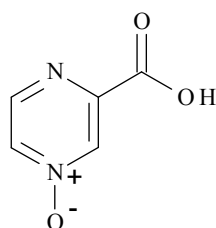
3.krok:



4.2.2 Příprava esterů



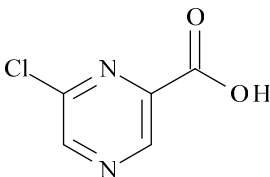
4.3 Příprava 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



27,8 g (0,2 mol) 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se zahřívá s 90 ml (0,22 mol) 10% roztoku hydroxidu sodného po dobu asi 4 hodin. Vyloučené krystaly sodné soli 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se odfiltrují a poté se rozpustí přibližně ve 100 ml horké vody. Vzniklý roztok se opět zfiltruje a ještě za horka se okyselí na pH 3 10% kyselinou chlorovodíkovou. Krystalizace se provádí z vody.

Molekulová hmotnost:	140,56
Teplota tání:	204-206 °C (dle literatury ³⁵ : 212-213 °C)
Výtěžek:	23,96 g (85 % teoretického výtěžku)

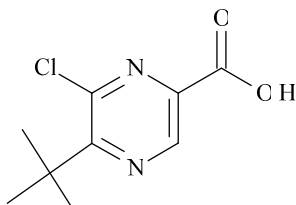
4.4 Příprava 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



30,0 g (0,2 mol) 4-oxidu 2-pyrazinkarboxylové kyseliny se smíchá se 170 g (1,87 mol) chloridu fosforu. Vzniklá směs se zahřeje na teplotu 40-50 °C, teplota poté ještě samovolně vzroste. Směs se zahřívá 15 minut a reakce se ukončí. Obsah baňky je ochlazen na 10-15°C . Vzniklý produkt je nutno po malých částech vylít na připravený led. Teplota v nádobě nesmí překročit 50 °C. Nezreagovaný chlorid fosforu je při styku s vodou rozkládán, což je doprovázeno exotermickou reakcí. Vzniklý vodný roztok byl postupně extrahován chloroformem. Organická vrstva se zfiltruje a produkt se od rozpouštědla oddělí ve vakuové odparce. Krystalizace se provádí z vody.

Molekulová hmotnost:	158,5
Teplota tání:	157-160 °C (dle literatury ³⁶ : 154-155 °C)
Výtěžek:	17,86 g (52,2 % teoretického výtěžku)

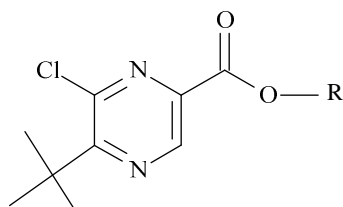
4.5 Příprava 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



7,5 g (0,05 mol) 6-chlor-2-pyrazinkarboxylové kyseliny, 0,9 g (0,005 mol) dusičnanu stříbrného, 5,1 g (0,05 mol) kyseliny pivalové se smíchá ve 200 ml vody a zahřeje se na teplotu 80 °C. K reakční směsi se v průběhu jedné hodiny za stálého míchání přikapává roztok 12,6 g (0,055 mol) peroxodisíranu amonného ve 30 ml vody. Teplota reakční směsi je poté ještě hodinu udržována. Po ochlazení ze směsi vypadne krystalická látka, která je překrystalizována ve směsi voda-ethanol.

Molekulová hmotnost:	214,6
Teplota tání:	108-111 °C (dle literatury ³⁴ : 108-110 °C)
Výtěžek:	1,2 g (11,82 % teoretického výtěžku)

4.6 Obecný postup přípravy esterů 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Metoda A)

500 mg 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny se v baňce rozpustí se 120 ml příslušného alkoholu, ke vzniklé směsi se přidá 0,5 ml kyseliny sírové a 4 hodiny se provádí extrakce pomocí Soxhletova přístroje naplněného 40 g hydrogenuhličitanu draselného. Po uplynutí reakční doby se k produktu přidá dostatečné množství toluenu a směs se po vytřepání přesaje přes fritu. Organické rozpouštědlo se z filtrátu odpaří na vakuové odparce, konečný produkt se vyčistí pomocí flash chromatografie.

Touto reakční metodou byl připraven pouze propylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové. Vzhledem k nízkému výtěžku bylo při zbylých esterifikacích přikročeno k metodě B.

Metoda B)

Ke 100 mg 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny se do speciální reakční zkumavky přidají 3 ml příslušného alkoholu a dvě kapky kyseliny sírové. Přidá se magnetické míchadlo a zkumavka se umístí do mikrovlnného reaktoru.

Všechny esterifikace probíhaly v mikrovlnném reaktoru CEM Explorer za těchto reakčních podmínek:

Tabulka č. 5: Reakční podmínky syntézy esterů v mikrovlnném reaktoru

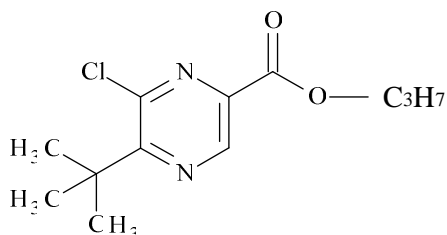
	Max. teplota [°C]	Reakční doba [min]	Max. tlak [barr]	Max. výkon [watt]
propylester	130	15	15	75
isopentylester	150	20	15	75
isopropylester	150	20,5	15	75 → 95
butylester	150	20,5	15	95
oktylester	150	20,5	15	95
isobutylester	105	30	0	75

Vzniklé produkty v podobě kapalin se naadsorbují na mořský písek a v této podobě se umístí na chromatografickou kolonu, kde dojde k separaci vzniklého produktu. K separaci se použije hexan a ethyl-acetát jako kapalná fáze, pevnou fází je silikagel. Při promývání separované směsi je použito gradientové eluce. Použitá organická rozpouštědla se z konečného produktu odstraní na vakuové odparce.

4.7 Nově připravené estery 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristika

4.7.1 Propylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 568



Produktem je tmavě žlutá olejovitá kapalina se sumárním vzorcem $C_{12}H_{17}ClN_2O_2$.

Výtěžek 71,1 %, $R_F = 0,82$, $M_R 256,73$.

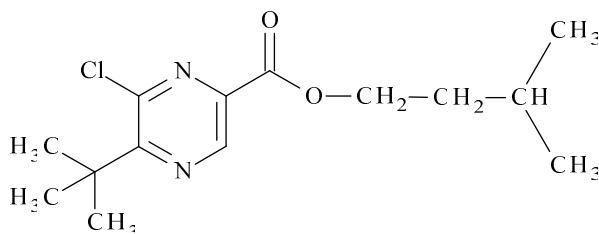
IČ spektrum ($CHCl_3$), [cm^{-1}]: 2855, 2845, 2835 (alkyl), 1715 (C=O), 1401, 1310, 1115 (pyrazin).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.07 (1H, s, H3), 4.38 (2H, t, $J=7.2$ Hz, OCH_2), 1.90-1.75 (2H, m, CH_2), 1.53 (9H, s, CH_3), 1.02 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.9, 163.1, 147.5, 141.7, 139.8, 77.4, 67.7, 38.9, 28.4, 22.6, 14.1, 10.3.

4.7.2 Isopentylester kyseliny 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 569



Produktem je olejovitá kapalina rezavé barvy se sumárním vzorcem $C_{14}H_{21}ClN_2O_2$.

Výtěžek 61,9 %, $R_F = 0,69$, $M_R 284,78$.

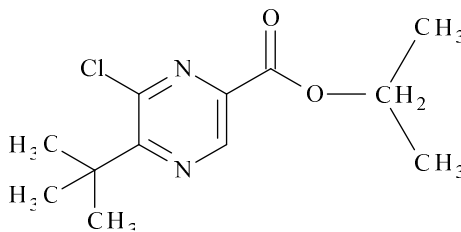
IČ spektrum ($CHCl_3$), [cm^{-1}]: 2855, 2850, 2845, 2835 (alkyl), 1712 (C=O), 1410, 1305, 1135 (pyrazin).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) d 9.03 (1H, s, H3), 4.35 (2H, t, $J=7.1$ Hz, OCH_2), 1.95-1.85 (2H, m, CH_2), 1.53 (9H, s, CH_3), 1.02 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) d 149.3, 145.8, 141.7, 77.4, 69.3, 64.9, 39.0, 38, 6, 37.2, 28.1, 25.1, 22.6, 22.2, 22.1.

4.7.3 Isopropylester kyseliny 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 570



Produktem je tmavě žlutá olejovitá kapalina se sumárním vzorcem $C_{12}H_{17}ClN_2O_2$.

Výtěžek 73,7 %, $R_F = 0,88$, $M_R 256,73$.

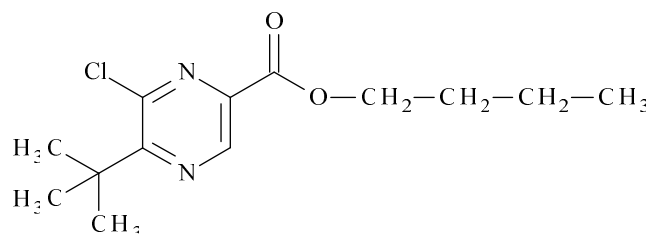
IČ spektrum ($CHCl_3$), [cm^{-1}]: 2860, 2843, 2835 (alkyl), 1715 (C=O), 1401, 1325, 1135 (pyrazin).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) d 9.05 (1H, s, H3), 4.40 (2H, t, $J=7.1$ Hz, OCH_2), 1.96-1.88 (2H, m, CH_2), 1.56 (9H, s, CH_3), 1.02 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) d 164.8, 163.1, 147.5, 141.7, 139.9, 77.4, 77.0, 66.1, 39.0, 30.5, 18.6, 13.7.

4.7.4 Butylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 571



Produktem je čirá krystalická látka se sumárním vzorcem $C_{13}H_{19}ClN_2O_2$.

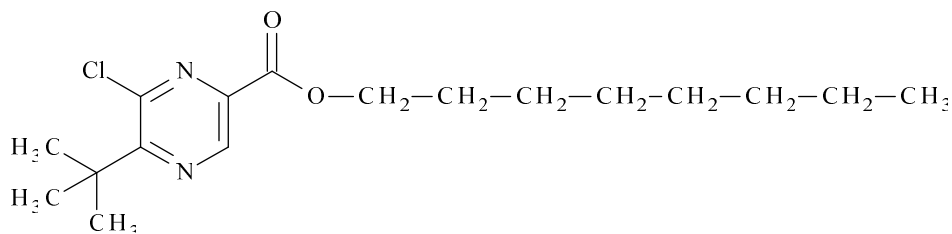
Výtěžek 60,4 %, $R_F = 0,92$, $M_R 270,76$, $T_t = 144-148$ °C.

1H NMR – struktura nesouhlasí

^{13}C NMR – struktura nesouhlasí

4.7.5 Oktylester kyseliny 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 572



Produktem je hnědá olejovitá kapalina se sumárním vzorcem $C_{17}H_{27}ClN_2O_2$.

Výtěžek 57,0 %, $R_F = 0,89$, $M_R 326,86$.

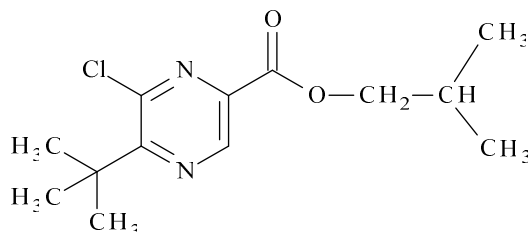
IČ spektrum ($CHCl_3$), [cm^{-1}]: 2873, 2860, 2845, 2835 (alkyl), 1705 (C=O), 1420, 1305, 1135 (pyrazin).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) d 9.03 (1H, s, H3), 4.41 (2H, t, $J=7.2$ Hz, OCH_2), 1.92-1.84 (2H, m, CH_2), 1.56 (10H, s, CH_2), 1.02 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) d 163.1, 141.7, 139.9, 77.4, 77.0, 76.6, 66.4, 39.9, 31.7, 29.2, 28.9, 28.2, 27.8, 25.8, 22.6, 18.6, 14.1.

4.7.6 Isobutylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové

MD 573



Produktem je světle žlutá olejovitá kapalina se sumárním vzorcem $C_{13}H_{19}ClN_2O_2$.

Výtěžek 72,3 %, $R_F = 0,76$, $M_R 270,76$.

IČ spektrum ($CHCl_3$), [cm^{-1}]: 2845, 2835, 2820 (alkyl), 1708 (C=O), 1420, 1335, 1105 (pyrazin).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.07 (1H, s, H3), 4.20 (2H, d, $J=6.8$ Hz, OCH_2), 2.21-2.04 (1H, m, CH), 1.53 (9H, s, CH_3), 1.01 (6H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.9, 163.0, 147.6, 141.6, 139.9, 77.4, 77.0, 76.6, 72.1, 39.0, 28.2, 27.8 19.1.

5 Biologické hodnocení

5.1 Antimykotická aktivita

Připravené deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly podrobeny *in vitro* testování na antifungální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd FaF v HK. Testování provedla Mgr. Marcela Vejsová a Iva Dufková se spolupracovníky.

U připravených sloučenin se antifungální aktivita testovala pomocí mikrodilučního bujónového testu. Vzorek byl nejprve naředěn roztokem RPMI 1640 s glutaminem a poté pufrován na pH 7,0 pomocí MOPS (0,165M). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí hodnot od 1000 do 0,975 μM . Aktivita byla testována jednak pomocí slepých roztoků (zde chyběla účinná látka) a dále byla určována u standardu, kterým je ketokonazol. Samotná inkubace probíhala při teplotě 35 °C a trvala 24 nebo 48 hodin, v případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenávány po 72 a 120 hodinách od počátku inkubace.

Testované kmeny (kód, číslo):

1. CA1 - *Candida albicans* ATCC 44859
2. CT - *Candida tropicalis* 156
3. CK2 - *Candida krusei* E28
4. CG - *Candida glabrata* 20/I
5. TB - *Trichosporon beigeli* 1188
6. AF - *Aspergillus fumigatus* 231
7. AC - *Absidia corymbifera* 272
8. TM - *Trichophyton mentagrophytes* 445

Tabulka č. 6: Aktivita stanovená pro standard (ketokonazol)

KMEN (kód)	inkubace	MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹) ketokonazol
CA	24h	<0,24
	48h	<0,24
CT	24h	1,95
	48h	3,91
CK	24h	0,98
	48h	1,95
CG	24h	0,49
	48h	1,95
TB	24h	<0,24
	48h	<0,24
AF	24h	7,81
	48h	7,81
AC	24h	31,25
	48h	31,25
TM	72h	0,98
	120h	1,95

Tabulka č. 7: Výsledky kultivace (antimykotická aktivita)

KMEN (kód)	Testovaná látka (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)						
	inkubace	MD 568	MD 569	MD 570	MD 571	MD 572	MD 573
CA	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
TB	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
AC	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
TM	24h	>500	>500	500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	500	>125	>500	>500

Pozn. hodnoty tučně = hodnota MIC se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací

5.2 Antibakteriální aktivita

Připravené sloučeniny byly podrobeny také testování *in vitro* aktivity vůči několika druhům bakterií. Testy proběhly na stejném pracovišti jako testy antifungální. Použita byla mikrodiluční bujónová metoda v destičkách.

Testované kmeny (kód, číslo):

1. SA - *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08
2. MRSA - *Staphylococcus aureus* H 5996/08 **Methicilin** rezistentní
3. SE - *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08
4. EF - *Enterococcus sp.* J 14365/08
5. EC - *Escherichia coli* CCM4517
6. KP - *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08
7. KP-E - *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 **ESBL** pozitivní
8. PA - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

Kmeny SA, EC a PA jsou doporučenými standardy pro zkoušení antibakteriální aktivity. Testované kmeny byly naočkovány na Mueller-Hintonův bujón při teplotě 35 °C a na tomtéž kultivovány při 4 °C. Příprava bakteriálních inokulí byla provedena suspenzací ve sterilním 0,85% fyziologickém roztoku. Buněčná hustota suspenze byla upravena na hodnotu $1,5 \times 10^8$ životaschopných jednotek tvořících kolonie (CFU) v jednom ml.

Připravené estery byly rozpuštěny v DMSO a jejich antibakteriální aktivita byla měřena v Mueller-Hintonově bujónu pufovaném na pH 7,0. Kontrolní roztoky byly tvořeny médiem a samotným DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovaném vzorku nepřesáhla 1 % (v/v) celkového složení roztoku. Minimální inhibiční koncentrace, tj. 95% inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s kontrolou, byla stanovována po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C ve tmě a humidní atmosféře.³⁷

Tabulka č. 8: Výsledky kultivace (antibakteriální aktivita)

KMEN (kód)	Testovaná látka (kód) – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)						
	inkubace	MD 568	MD 569	MD 570	MD 571	MD 572	MD 573
SA	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
EF	24h	125	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	250	>500	>500	>125	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>125	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>125	>500	>500

Pozn. hodnoty tučně = hodnota MIC se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací

5.3 Antituberkulotická aktivita

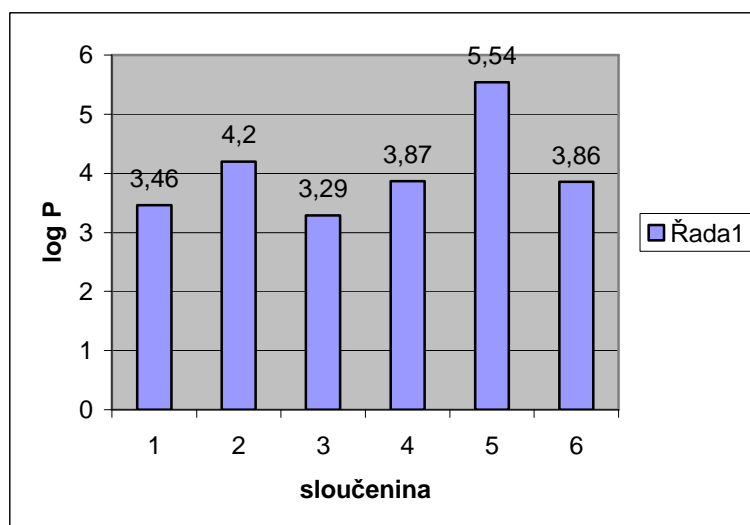
Nově syntetizované látky byly odeslány na *in vitro* testování účinnosti proti kmenu *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, což bylo umožněno existencí mezinárodního programu zajišťující testování nových potenciálních antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility). Testování probíhá na *M. tuberculosis* H₃₇Rv v BACTEC 12B médiu použitím BACTEC 460 radiometrického systému.³⁸

Výsledky antituberkulotického testování nejsou dosud k dispozici.

5.4 Lipofilita připravených sloučenin

	sloučenina	log <i>P</i>
1	MD 568	3,46
2	MD 569	4,2
3	MD 570	3,29
4	MD 571	3,87
5	MD 572	5,54
6	MD 573	3,86

Grafické znázornění lipofility připravených sloučenin:



6 Diskuse

Cílem diplomové práce byla syntéza strukturně zcela originálních esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Vycházeli jsme ze skutečnosti, že kyselina pyrazin-2-karboxylová je vlastní účinnou látkou uvnitř buněk mykobakterií. Vzhledem k vysokému podílu lipidických látek ve stěně mykobakterií bylo výhodné na základní strukturu navázat vhodné hydrofobní substituenty ke zvýšení lipofility – v našem případě se jednalo o skupinu *terc*-butylovou a chloridovou.

Bylo připraveno šest nových sloučenin, jejichž výchozí strukturou je kyselina 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylová. Syntéza butylesteru této kyseliny se nezdařila. Tato skutečnost byla patrně zapříčiněna nedokonalou čistotou použitého butylalkoholu.

Syntéza probíhala v mikrovlnném reaktoru, což mělo pozitivní vliv na celkové výtěžky jednotlivých esterů. Tyto se pohybovaly v rozmezí 57,0-73,7 %.

Výsledné látky byly přečištěny pomocí flash chromatografie a charakterizovány ^1H a ^{13}C NMR spektrem, IČ spektrem, TLC, molekulovou hmotností a byl vypočítán $\log P$.

$\log P$ je jedním z hlavních parametrů určování kvantitativních vztahů mezi strukturou dané sloučeniny a jeho aktivitou. Nejčastěji je stanoven v systému *n*-oktanol – voda.³⁹ Vypočítaná hodnota $\log P$ u vzniklých sloučenin se pohybovala v rozmezí 3,29-5,54. Je patrné, že lipofilita roste se stoupající molekulovou hmotností, tedy v našem případě je její hodnota ovlivněna rozdílnou délkou řetězce alkoholu použitého k esterifikaci výchozí kyseliny.

Připravené látky byly odeslány na testování antituberkulotické aktivity do TAACF. Výsledky však nebyly v době odevzdávání diplomové práce k dispozici.

Antimykotická aktivita připravených látek byla *in vitro* testována na osmi kmenech původců mykobakterií. Velmi slabou aktivitu (ve srovnání se standardem – ketokonazolem) bylo možno vyhodnotit u isopropylesteru kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes*. $\log P$ tohoto esteru je 3,29.

Byly provedeny *in vitro* testy na antibakteriální aktivitu proti několika druhům bakterií. Určitou antibakteriální aktivitu vykazoval propylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové proti *Enterococcus sp.* Log *P* tohoto esteru je 3,46.

U všech připravených esterů kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové nebyla *in vitro* testováním stanovena dostatečná antimykobakteriální aktivita, což svědčí o nízkém potenciálu těchto látek stát se součástí léčby mykobakterióz.

7 Závěr

V rámci této diplomové práce jsem se zabývala těmito úkoly:

- V návaznosti na poznatky získané v dostupné chemické literatuře jsem zmapovala současné přístupy k léčbě TBC, včetně používaných a také potenciálních antituberkulotik.
- Na základě informací v dostupné chemické literatuře jsem se seznámila s postupy přípravy substituovaných esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
- Příprava daných esterů pyrazin-2-karboxylové kyseliny probíhala v mikrovlnném reaktoru za předem určených podmínek.
- Připraveny byly následující originální produkty:
 - propylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové
 - isopentylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové
 - isopropylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové
 - oktylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové
 - isobutylester kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylovéV případě butylesteru kyseliny 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové struktura nesouhlasila.
- Výše uvedené produkty byly charakterizovány ^1H a ^{13}C NMR spektrem, IČ spektrem, TLC a molekulovou hmotností.
- Bylo provedeno *in vitro* biologické hodnocení zaměřené na antifungální a antibakteriální aktivitu této série látek. Výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity zatím nejsou k dispozici.
- Pomocí počítačového programu CS ChemBioOffice Ultra byly zjištěny hodnoty $\log P$ připravených látek a graficky znázorněny.

- Snažila jsem se o nalezení vztahu mezi strukturou připravených esterů, jejich biologickou aktivitou a lipofilitou. Tato snaha však byla limitována nepatrnou antifungální a antibakteriální aktivitou těchto látek. Antimykobakteriální testování nebylo ke dni odevzdání práce dokončeno, proto nemohlo být toto vzhledem ke struktuře připravených látek pojednáno.

8 Použitá literatura

1. Homolka, J.; Votava, V.: *Tuberkulóza*, 3.vydání, Praha, Karolinum, 2003, 79 s. [ISBN 80-246-0630-50]
2. Kober, L.: Tuberkulóza – co o ní vědí naši pacienti?, *Sestra*, 2009, no. 7-8, s. 33-34. [ISSN 1210-0404]
3. *Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR* [on-line]. Trnka, L., 2009, [cit. 2009-10-28]. URL: < http://uzis.cz/news.php?mnu_id=1100 >.
4. Pokorný, A.; Merta, Z.; Salajka, F.: *Tuberkulóza*, 1.vydání, Brno, MU, 1998, 54 s. [ISBN 80-210-1851-8]
5. Bajan, A.: *Tuberkulóza*, 1.vydání, Martin, Osveta, 1990, 210 s. [ISBN 80-217-0078-5]
6. *Státní zdravotní ústav* [on-line]. Filipiová, 2009, [cit. 2009-11-07]. URL: < http://www.szu.cz/uploads/documents/vyhl_65_2009.pdf >.
7. World Health Organization: *Treatment of Tuberculosis: guidelines*, 4.vydání, Geneva, WHO, 2010, s. 34-36. [ISBN 9489241547833]
8. Lincová, D; Farghali, H., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2.vydání, Praha, Galén, 2007, s. 489-501. [ISBN 978-80-7262-373-0]
9. Hartl, J.; Doležal, M., et al.: *Farmaceutická chemie IV.*, 1.vydání, Praha, Karolinum, 2006, s. 99-124. [ISBN 80-246-1169-4]
10. Toman, K., et al.: *Toman's tuberculosis: Case Detection, Treatment, and Monitoring: Questions and Answers*, 2.vydání, Geneva, WHO, 2004, s.110-111. [ISBN 92 4 154603 4]
11. Leonid, Heifets B., et al.: *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*, 1.vydání, Florida, CRC Press, 1991, s. 20-22. [ISBN 0-8493-6716-6]
12. Korvick, Joyce A., et al.: *Mycobacterium avium-Complex Infection: Progress in Research and Treatment*, 1.vydání, New York, Informa Healthcare, 1995, s. 210. [ISBN 0-8247-9403-6]
13. Kraus, P; Krausová, E.; Šimáně, Z.: *Antituberkulotika*, 1.vydání, Praha, Spofa, 1966, s. 46-47, 68, 111.
14. Cynamon, M. H; Klemens, S. P.: Antimycobacterial Activity of a Series of Pyrazinoic Acid Esters. *J. Med. Chem.* 1992, vol. 35, No. 7, s. 1212 – 1215.
15. Cynamon, M. H., et al.: Pyrazinoic Acid Esters with Broad Spectrum in Vitro Antimycobacterial Activity. *J. Med. Chem.* 1995, vol. 38, No. 38, s. 3902 – 3907.
16. *Science Direct* [on-line]. Rivers, Emma C.; Mancera, Ricardo L., 2008, [cit. 2009-11-28]. URL:<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXX-4X1X4JV-1&_user=9047838&_coverDate= >
17. Doležal, M.: Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chem.listy* 2006, vol. 100, s. 959-966.

18. Červinka, O; Dědek, V; Ferles, M.: *Organická chemie*, 2.vydání, Praha, SNTL, 1980, s. 703-704.
19. Červinka, O., et al.: *Mechanismy organických reakcí*, 2. vydání, Praha, SNTL/ALFA, 1981, s. 155.
20. Katritzky, A.R., et al.: *Advances in heterocyclic chemistry, Volume 14*, New York, Academic Press, 1972, s. 192-193.
21. Svoboda, J.: *Organická chemie I.*, 1.vydání, Praha, Vydavatelství VŠCHT, 2005, s. 265, 284-285. [ISBN 80-7080-561-7]
22. Nováček, L; Palát, K; Čeladník, M.: *Chem.listy* 57, 299 (1963).
23. Nováček, L; Palát, K; Čeladník, M; Kubala, E.: *Česk. Farm.* 21, 145 (1972).
24. Nováček, L; Palát, K; Čeladník, M; Holík, M.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 37, 862 (1972).
25. Asai, M.: *Yakugaku Zasshi* 81, 1475 (1961); in *Chem. Abstr.* 56, 8711c (1962).
26. Bernardi, L; Palamidessi, G; Leone, A; Larini, G.: *Gaz. Chim. Ital.* 91, 1431 (1961).
27. Foks, H.: *Acta Pol. Pharm.* 33, 153 (1976).
28. Palamidessi, G; Vigevani, A; Zarini, F.: *J. Heterocycl. Chem.* 11, 607 (1974).
29. Okada, S; Kosasayama, A; Konno, T., et al.: Pyrazine derivatives 2. Synthesis, reactions, and spectra of pyrazine *N*-oxide derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 1971, vol. 19, No. 7, p. 1344.
30. Sato, N. : *J. Chem. Res.*, 1984,(S) 318.
31. Abe, Y; Shigeta, Y; Uchimaru, F., et al.: (Daiichi Seivaku Co., Ltd.): Methyl-6-methoxypyrazine-2-carboxylate. *Japan Pat.* 69 12, 898 (1969); in *Chem. Abstr.* 71, 112 979y (1969).
32. Ambroggi, V., et al.: Anti-lipolytic activity of a series of pyrazine-*N*-oxides. *Eur. J. Med. Chem.* 1980, vol. 15, No. 2, p. 157-163.
33. *LabHut* [on-line]. [cit. 2009-10-22].
URL: < <http://www.labhut.com/education/flash/index.php> >
34. *Informační systém Masarykovy univerzity* [on-line]. Lišková, M. Mikrovlnná chemie, 2008, [cit. 2009-10-22]
URL: < http://is.muni.cz/th/77987/prif_m/mikrovlny.doc >
35. Foks, H; Janowiec, M; Zieleniecki, M.: *Pol. J. Pharm.* 29, 663 (1977).
36. Abe, Y; Shigeta, Y; Uchimaru, F., et al.: *Japan Pat.* 69 12, 898 (1969); *Ref. Chem. Abstr.* 71, 112979y (1969).
37. Jones, R.N; Barry, A.L.: Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *Journal of Clinical Microbiology* 1987, 25:1920-1925.
38. Doležal, M; Vičík, R; Miletín, M., et al.: *Chem Pap.*, 54, 245 (2000).
39. Hartl, J; Palát, K.: *Farmaceutická chemie I.*, 1.vydání, Praha, Karolinum, 2004, s. 91. [ISBN 80-7184-619-8]