UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika,
http://www.faf.cuni.cz
tel. +420495067111, fax +420495518002

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: **farmaceutické chemie a kontroly léčiv**	Na akademický rok: 2010/2011

Jméno příjmení: **Michaela Horká**

Studijní program: **Farmacie**

Vedoucí diplomové práce:
doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Název diplomové práce:
Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva I.

Název diplomové práce v angličtině:
Amidoximes as synthetic intermediates and potential drugs I.

Zásady pro vypracování:

Úkolem diplomantky je provést literární rešerši na zadané téma a výsledky rešerše přehledně zpracovat v teoretické části. V experimentální části se bude zabývat syntézou amidoximů odvozených od substituovaných pyrazinkarbonitrilů. Experimenty budou prováděny v laboratořích katedry podle pokynů školitele za důsledného dodržování metodických postupů a pravidel bezpečné práce v chemické laboratoři. Dosažené výsledky budou kriticky zhodnoceny v diskusi. Rozsah a členění diplomové práce budou odpovídat zásadám obvyklým pro práce farmaceuticko-chemického charakteru.

Seznam odborné literatury:
Chemical Abstracts **Beilstein´s Handbuch der organischen Chemie** **počítačové databáze (Medline, Web of Science)** **originální časopisecká,knižní a patentová literatura** **Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690. Chem. Listy 2001, 95, 431 - 438** **Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690 - oprava chyb. Chem. Listy 2001, 95, 683 - 684** **Doporučení redaktorům odborných a popularizačních časopisů přírodovědeckého zaměření, autorům vysokoškolských i středoškolských přírodovědných učebnic a tvůrcům odborných právních textů s touto tematikou. Chem. Listy. 2004, 98, 943 - 949**

Datum zadání diplomové práce:	**15. 11. 2009**

Termín odevzdání diplomové práce:	**15. 5. 2011**

doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.
vedoucí katedry

Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
děkan fakulty

V Hradci Králové dne: **2011-01-18**

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

AMIDOXIMY JAKO SYNTETICKÉ INTERMEDIÁTY A POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.

Diplomová práce

Hradec Králové 2011 Michaela Horká

Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. děkuji za její vstřícnost a ochotu, za cenné rady a pomoc, kterou mi poskytla při vzniku této práce.

Dále děkuji paní V. Hronové za provedení elementárních analýz, paní H. Jílkové za změření IČ spekter, doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter a paní I. Dufkové za provedení biologických testů.

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

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2011-263-001.

OBSAH

ABSTRAKT 7
ABSTRACT 8
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE 9
2 TEORETICKÁ ČÁST 10
2.1 Účinky amidoximů na srážlivost krve a vazodilataci cév 10
2.1.1 Antitrombotické účinky amidoximů 10
2.1.2 Amidoximy jako donory NO a vazodilatace cév 14
2.2 Vliv amidoximů na nežádoucí účinky léčiv 17
2.3 Antimikrobiální účinky amidoximů 19
2.3.1 Antiprotozoální účinky 19
2.3.2 Antifugální účinky amidoximů 22
2.3.3 Antibakteriální účinnost amidoximů 24
3 METODICKÁ ČÁST 28
3.1 Možnosti přípravy amidoximů 28
3.1.1 Příprava reakcí nitrilu s hydroxylaminem 28
3.1.2 Příprava reakcí amidů a thioamidů s hydroxylaminem 28
3.1.3 Příprava redukcí kyseliny nitrosolové a nitrolové 29
3.1.4 Příprava reakcí chloridu hydroximové kyseliny s amoniakem 29
3.1.5 Příprava reakcí hydroxylaminu s iminoethery ..... a hydrochloridy amidinů 30
3.1.6 Další metody přípravy amidoximů 30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 31
4.1 Chemická část 31
4.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů 32
4.1.2 Příprava N´-hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů 34
4.2 Biologická část 39
4.2.1. Testované sloučeniny 39
4.2.2 Hodnocení antifungální aktivity 39
4.2.3 Hodnocení antibakteriální aktivity 40
5 DISKUSE 42
6 ZÁVĚR 44
7 LITERATURA 45

ABSTRAKT

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuté biologické účinky amidoximů. Jsou studovány hlavně jako proléčiva, která se redukcí mění na aktivní látky – amidiny. Některé amidoximy se dostaly do klinických studií, ale pro jejich závažné nežádoucí účinky byl další výzkum ukončen.

V metodické části jsou popsány možnosti přípravy amidoximů různými syntetickými postupy.

V rámci experimentální části byly připraveny nejdříve čtyři 5-alkyl-pyrazin-2-karbonitrily a z nich reakcí s hydroxylamin-hydrochloridem byly získány příslušné amidoximy:

- *N*´-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*´-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*´-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*´-hydroxy-5-hexylpyrazin-2-karboximidamid.

Žádný ze získaných produktů nebyl dosud popsán v literatuře. Všechny připravené amidoximy byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry. Čistota byla ověřena elementární analýzou.

Tyto látky byly testovány na antifungální a antibakteriální účinnost, ale byly neaktivní. To je patrně dáno skutečností, že v testech *in vitro* nedochází k jejich aktivaci na odpovídající amidiny.

ABSTRACT

In the theoretical part of this diploma thesis, biological activities of amidoximes are resumed. They have been studied mainly as prodrugs that are reduced to active compounds – amidines. Some amidoximes reached clinical trials but due to their significant undesirable effects have not been developed further.

Methodical part deals with various synthetic procedures for the preparation of amidoximes.

In the frame of the experimental part, four 5-alkylpyrazine-2-carbonitriles were synthesized at first. Using hydroxylamine hydrochloride, the nitriles were converted to corresponding amidoximes:

- *N*′-hydroxy-5-propylpyrazine-2-carboximidamide
- *N*′-hydroxy-5-isopropylpyrazine-2-carboximidamide
- *N*′-hydroxy-5-pentylpyrazine-2-carboximidamide
- *N*′-hydroxy-5-hexylpyrazine-2-carboximidamide

None of the obtained products have been reported yet. They were characterized by melting points, IR, NMR spectra. Their purity was checked by elemental analysis.

The compounds were tested for antifungal and antibacterial activity but were found non-effective. This is probably due to the fact that *in vitro* their bioactivation does not proceed.

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Pyrazinkarbonitril byl připraven v 50. letech 20. století a studován jako potenciální antituberkulotikum [1] a antagonista nikotinamidu [2]. Jako léčivo nebyl nikdy používán, je však důležitým intermediátem pro syntézu dalších sloučenin [3–20]. Zcela nedávno bylo zjištěno, že je ireverzibilním inhibitorem nikotinamidasy – enzymu, který je nezbytný pro hydrolýzu pyrazinamidu na aktivní pyrazinkarboxylovou kyselinu [21].

Na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové jsou pyrazinkarbonitril a jeho 5-alkylované deriváty používány především k přípravě odpovídajících 1-pyrazin-2-yl-ethanonů [22, 23]. Ty pak jsou dále využívány pro přípravu dalších derivátů, např. chalkonů [24–27], thiosemikarbazonů [28] a derivátů rhodaninu [29, 30]. Reakcí 1-pyrazin-2-yl-ethanonů (acetylpyrazinů) s hydroxylaminem lze připravit odpovídající oximy, jimž je na katedře rovněž věnována pozornost [31]. Analogicky lze reakcí pyrazinkarbonitrilů s hydroxylaminem získat amidoximy [32–34].

Amidoximy jsou sloučeniny nesoucí jak hydroxyimino, tak amino skupinu na jednom atomu uhlíku, což jim umožňuje být mnohostrannými stavebními kameny pro syntézu různých heterocyklů. Amidoximy a jednoduché *O*-substituované deriváty mají velmi důležité biologické vlastnosti: antituberkulotické, antibakteriální, bakteriostatické, fungicidní, antineoplastické, antihypertenzivní, protizánětlivé, antiagregační a další. V analytické chemii se amidoximy používají při kvantitativním spektrofotometrickém stanovení těžkých kovů, jako jsou kadmium (II), vanad (V) a osmium (VIII). Některé amidoximy jsou již používány jako léčiva, jiné jsou v současné době podrobeny klinickým testům. Jejich četné farmaceutické použití je v současnosti obohaceno faktem, že jsou schopny se přeměnit na amidiny a dále jsou schopny uvolňovat NO [35].

Cílem mé diplomové práce je příprava a charakterizace amidoximů odvozených od 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů. V případě, že syntézy budou úspěšné, bude u připravených amidoximů hodnocena antifungální a antibakteriální účinnost, případně další biologické aktivity. Později mohou být připravené amidoximy využity pro syntézu dalších sloučenin, např. 1,2,4-oxadiazolů.

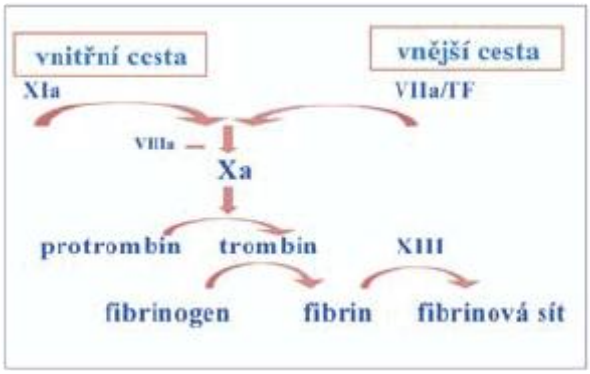
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Účinky amidoximů na srážlivost krve a vazodilataci cév

2.1.1 Antitrombotické účinky amidoximů

Trombembolická onemocnění, mezi které patří například hluboká žilní trombóza, plicní embolie nebo infarkt myokardu, jsou hlavními příčinami morbidity a mortality v rozvinutých zemích. V současnosti dostupná antikoagulancia, jako jsou warfarin, heparin a nízkomolekulární hepariny, se běžně používají pro prevenci i pro léčbu trombembolických onemocnění, nicméně mají mnoho terapeutických limitů [36]. Například úzké terapeutické okno, monitorování a měření protrombinového času, ovlivnění stravou obsahující vitamin K, vysoký interakční potenciál s ostatními léčivy, ovlivnění cytochromu P450 a další [37]. Proto je přitažlivým cílem hledání orálně aktivních antitrombotických látek. Může se jednat o inhibitory faktoru Xa nebo přímé inhibitory trombinu, případně sloučeniny ovlivňující shlukování trombocytů [38].

Faktor Xa je serinová proteinasa, která štěpí během koagulační kaskády protrombin na trombin, což vede ke štěpení fibrinogenu na fibrin a následně k tvorbě krevní sraženiny. Kvůli své důležité roli v krevní koagulaci se stal faktor Xa jedním z cílů pro rozvoj nových perorálních antitrombotických látek. V praxi používaným inhibitorem faktoru Xa je rivaroxaban (XARELTO) a další sloučeniny působící tímto mechanismem jsou v klinickém hodnocení [39–41].



Obr. 1 Role faktoru Xa v koagulační kaskádě [39]

Mezi potenciální inhibitory faktoru Xa patří také amidinové deriváty studované v Japonsku. Ve snaze zlepšit jejich perorální dostupnost a farmakokinetické vlastnosti byla připravena profarmaka typu amidoximů [42].

Amidiny můžeme jako potenciální léčiva nalézt nejen ve skupině inhibitorů faktoru Xa, ale také mezi přímými inhibitory trombinu a antagonisty receptoru GP-IIb/IIIa. Jejich nevýhodou je, že mají nízkou biologickou dostupnost. Jsou to silně bazické látky, ve fyziologických podmínkách jsou obvykle protonizovány na atomu dusíku s dvojnou vazbou a vytvoří vysoce stabilní mezomerní kation (Schéma 1). Následkem toho většinou nejsou absorbovány z gastrointestinálního traktu po orálním podání. *N*-hydroxylované deriváty amidinů (amidoximy) jsou méně bazické díky začlenění kyslíkového atomu, jsou absorbovány z gastrointestinálního traktu a pak jsou redukovány na odpovídající aktivní amidiny. Pokud mají být amidoximy vhodným proléčivem amidinů, měly by být převážně metabolizovány redukcí a ostatní metabolické cesty, např. přeměna na NO, citrulinové analogy, nebo tvorba glukuronidů a sulfátů, by měly mít minimální metabolický význam. V mnoha odlišných *in vivo* studiích bylo prokázáno, že *in vivo* převažuje redukce amidoximů na amidiny [43, 44] a byl již také popsán enzymový systém, který se na jejich redukci podílí [45–48].

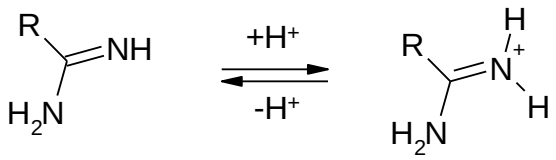
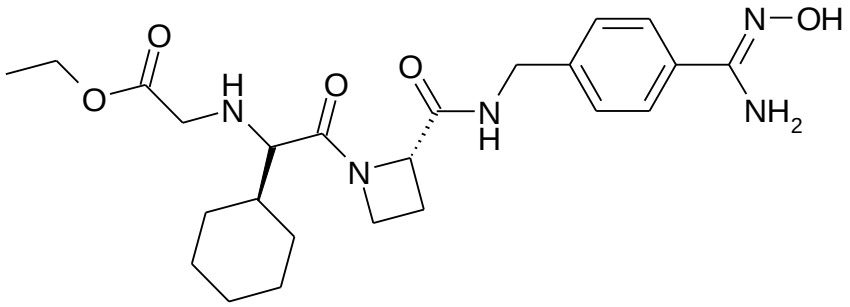
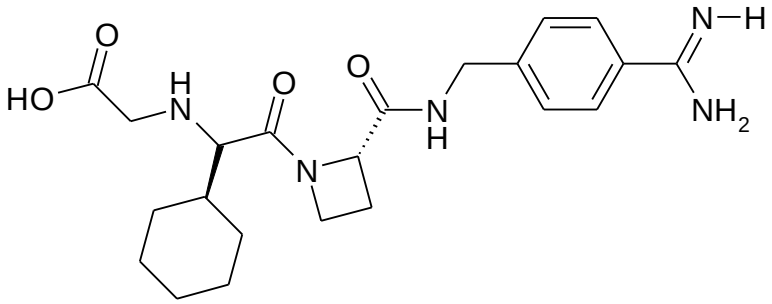


Schéma 1 Protonizace amidinu a tvorba mezomerního kationtu [43].

Příkladem amidoximu jako proléčiva je **ximelagatran**, který se mění na účinný metabolit **melagatran**. Ximelagatran má *N*-hydroxylovanou amidinovou skupinu a esterifikovanou karboxylovou skupinu, což způsobuje, že je 170× lipofilnější než melagatran a neionizuje v pH prostředí tenkého střeva [37].



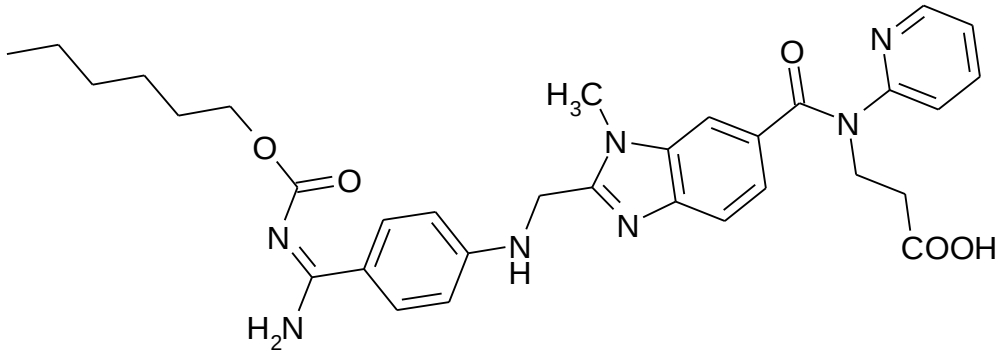
ximelagatran



melagatran

Ximelagatran je přímý orální inhibitor trombinu, má 3 – 5× vyšší biodostupnost po orálním podání než melagatran a jeho biodostupnost není dramaticky ovlivněna současným podáním potravy. Po rychlé absorpci je ximelagatran konvertován na účinný melagatran, jehož maximální plazmatická koncentrace je pozorována už po 1,5 – 2 hodinách po orálním podání, což je srovnatelné se subkutánním podáním nízkomolekulárního heparinu. Následkem toho by bylo možné ximelagatran použít k okamžité léčbě hluboké žilní trombózy bez použití nízkomolekulárního heparinu, jak je požadováno na začátku terapie warfarinem. Melagatran není metabolizován a je přibližně z 80 % vylučován renální exkrecí. Poločas rozpadu melagatranu narůstá s věkem a je zavislý na funkci ledvin, ale i přesto je u typického 70letého pacienta okolo 4 – 5 hod. Po provedení *in vivo* studií na zdravých dobrovolnících bylo zjištěno, že ximelagatran, ani melagatran neovlivňují metabolismus jiných léčiv metabolizovaných izoenzymy CYP450 [37, 49]. I přes svoje výhodné vlastnosti byl ximelagatran terapeuticky používán pouze krátce. V roce 2006 byl stažen z používání pro hepatotoxické účinky [38, 50]. Nadále však zůstává důležitým farmakologickým nástrojem při studiu DILI (drug-induced liver injury) [51–56].

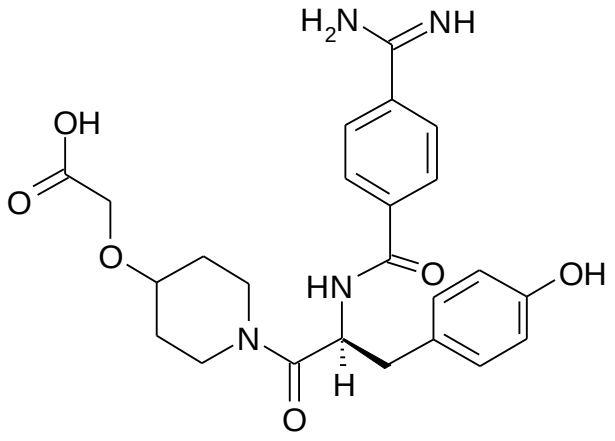
V praxi používaný přímý inhibitor trombinu **dabigatran-exetilát** (PRADAXA) je proléčivo určené k perorálnímu podávání, z něhož se v plazmě a v játrech enzymovou hydrolýzou uvolňuje účinný dabigatran [57]. Nemá však charakter amidoximu.



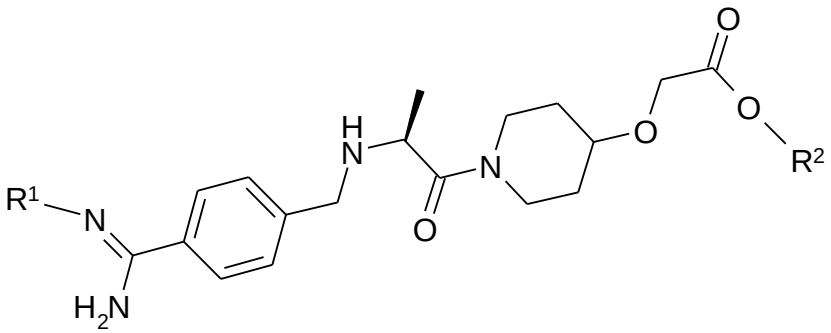
dabigatran-exetilát

Jedním z důležitých kroků při tvorbě krevní sraženiny je vazba fibrinogenu na receptor GP-IIb/IIIa (označovaný též jako $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) na povrchu krevních destiček. Na α řetězci fibrinogenu byla objevena tripeptidová sekvence Arg-Gly-Asp (RGD), hlavní doména, zodpovědná za rozpoznání fibrinogenu glykoproteinem IIb/IIIa. Inhibice vazby fibrinogenu na GP-IIb/IIIa se již terapeuticky využívá. Nejstarším léčivem s tímto mechanismem účinku je monoklonální protilátka abciximab (REOPRO). Z peptidů obsažených v hadích jedech je nejznámější eptifibatid (INTEGRILIN). Z nepeptidových antagonistů byl do praxe zaveden tirofiban (AGGRASTAT). Všechny tři sloučeniny se podávají intravenózně [59, 60].

Celá řada studovaných „fibanů“ má charakter amidinů a byla u nich připravena řada profarmak typu esterů a amidoximů [35, 61, 62]. **Lamifiban** (Ro 44-9883) je selektivní, reverzibilní, nepeptidový antagonista receptoru glykoproteinu IIb/IIIa podávaný intravenózně [63].



lamifiban



Ro 44-3888: $R^1 = R^2 = H$

sibrafiban: $R^1 = OH$, $R^2 = ethyl$

Sibrafiban (Ro 48-3657) je dvojité proléčivo sloučeniny Ro 44-3888. Byl navržen k perorálnímu podání. Stejně jako ximelagatran má *N*-hydroxylovanou amidinovou skupinu a esterifikovanou karboxylovou skupinu. Po podání se nejprve rozštěpí esterová vazba a vzniká neaktivní meziprodukt, až následně se redukuje amidoxim na účinný amidin. Aktivní metabolit je vysoce selektivní, reverzibilní inhibitor receptoru glykoproteinu IIb/IIIa, inhibuje agregaci krevních destiček vyvolanou různými agonisty (adrenalin, kolagen, trombin …) [64, 65]. Žádný z amidinů, ani amidoximů však nebyl dosud do klinické praxe zaveden.

2.1.2 Amidoximy jako donory NO a vazodilatace cév

NO u savců vzniká z L-argininu ve dvoukrokové reakci katalyzované enzymem NO-synthasou (NOS). Nejdříve vznikne N^{ω}-hydroxy-L-arginin (NOHA) a ten je následně metabolizován za přítomnosti NADPH a O_2 na citrulin a NO. Na

N-hydroxylaci je zapotřebí specifické NOS, kdežto oxidativní štěpení vazby C=NOH u NOHA na NO nebo jiné oxidy dusíku nemusí být katalyzováno pouze NOS, ale také mikrosomálními enzymy CYP450 nebo peroxidasami. Tyto enzymy mohou štěpit stejnou vazbu i u některých syntetických sloučenin neobsahujících alfa-aminokyselinu, např. *N*-hydroxyguanidiny, amidoximy a ketoximy [66–68].

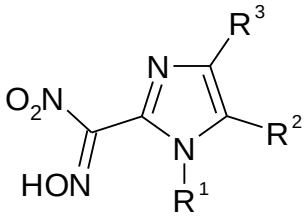
V cévách endoteliální NOS katalyzuje vznik NO, hlavního ochranného faktoru. Zabraňuje adhezi leukocytů na stěny cév, agregaci krevních destiček a také inhibuje proliferaci a kontrakci hladké svaloviny stěn cév. Navíc je NO tvořen makrofágy při imunologických reakcích a neurony centrálního nervového systému, kde působí jako neuromediátor v základních fyziologických funkcích, včetně mírnění bolesti. Nedostatek NO je spojen s hypertenzí, ischemickou chorobou srdeční, srdečním selháním a infarktem myokardu stejně jako s erektilní dysfunkcí. Některé patologické stavy (diabetes, hypercholesterolémie, ateroskleróza) jsou spojovány s nedostatečnou aktivitou NOS. V těchto situacích může být obnovena hladina NO pomocí štěpení exogenních substrátů nespecifickými enzymy [67, 68].

Donory NO, jako je trinitroglycerin, jsou látky používané v terapii k vyrovnání NO deficitu. Donory NO jsou rychle a neselektivně přeměňovány na NO a mají krátký poločas rozpadu. Prodloužit poločas rozpadu lze nalezením chemicky a metabolicky stabilnější sloučeniny, která by byla selektivně oxidována NOS in situ a přeměněna na NO v dané tkáni. Bylo připraveno mnoho sloučenin obsahujících skupinu C=NH nebo C=NOH a byly studovány jako potenciální donory NO. Avšak jenom ty, které zahrnují $NHC(NH_2)=NH$ (nebo NOH) část, vedou k významné tvorbě NO [68].

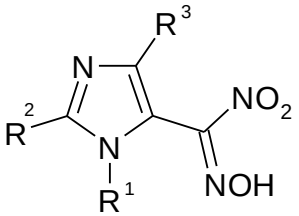
Při výzkumu *N*-hydroxyguanidinů, amidoximů a ketoximů, sloučenin vhodných k oxidaci NO-synthasou nebo příbuznými monoxygenasami, se objevil problém s neselektivním vznikem oxidů dusíku, včetně NO. Sloučeniny nesoucí skupinu C=NOH jsou snadno oxidovatelné mnoha chemickými látkami, např. H_2O_2, MnO_2, $Pb(OAc)_4$ za vzniku oxidů dusíku. Všechny oxidace *N*-hydroxyguanidinů katalyzované isoenzymy cytochromu P450 a NOSs jsou neselektivní z hlediska substrátu i produktů a vedou ke vzniku nejen oxidů dusíku, ale i k odpovídající močovině a kyanamidu. Navíc jsou tyto reakce ve velké míře inhibovány superoxid-dismutasou za vzniku radikálu $O_2^{\bullet-}$, který sám oxiduje *N*-hydroxyguanidiny a amidoximy za vzniku močoviny a kyanamidů a oxidů dusíku.

Podobné problémy se neobjevily během výzkumu guanidinů jako vhodných substrátů pro NOS a vznik NO, protože jsou stabilnější vůči radikálu $O_2^{\bullet-}$ ve srovnání s *N*-hydroxyguanidiny [69].

NO hraje důležitou roli také v regulaci procesů probíhajích v očích a poruchy uvolňování NO mohou vést k rozvoji degenerativních (glaukom, degenerace sítnice, katarakta) a zánětlivých (uveitis, retinitis) očních onemocnění. Je také známo, že NO a jeho druhý posel (cGMP) snižují nitrooční tlak [70]. Oresmaa se spolupracovníky připravili jako potenciální donory **imidazol-2-nitrolové kyseliny** [70], **imidazol-5-nitrolové kyseliny** [70], **imidazol-5-amidoximy** [71], **5-kyanimidazol-4-amidoximy** [71].

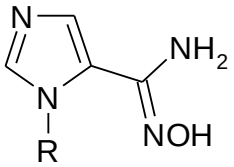


imidazol-2-nitrolové kyseliny

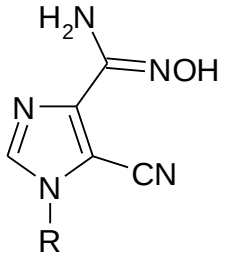


imidazol-5-nitrolové kyseliny

R^1 = H, methyl, benzyl; R^2 = H, fenyl; R^3 = H, methyl



imidazol-5-amidoximy



5-kyanoimidazol-4-amidoximy

R = H, methyl, benzyl

Některé imidazol-2-nitrolové kyseliny zvyšovaly množství cGMP v prasečím řasnatém tělísku, králičím očním moku a králičí plazmě, což svědčí o tom, že uvolňují NO. Dále snižovaly nitrooční tlak při intravitreálním podání králíkům, avšak při povrchové aplikaci byly neúčinné [70]. Podobných výsledků bylo dosaženo při studiu imidazol-5-amidoximů. 5-Kyanoimidazol-4-amidoximy byly neúčinné. Neúčinnost

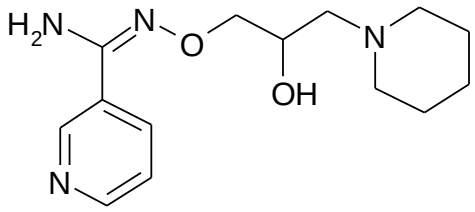
sloučenin při povrchové aplikaci je dána jejich špatným průnikem do oka [71]. Z toho důvodu byly v následující studii [72] připraveny estery nejúčinnějších sloučenin – *N´*-hydroxy-1-methyl-1*H*-imidazol-5-karboximidamidu a 1*H*-imidazol-5-nitrolové kyseliny – s kyselinou octovou, propionovou a pivalovou. Esterifikace však vedla ke ztrátě aktivity.

2.2 Vliv amidoximů na nežádoucí účinky léčiv

Cisplatina je jedna z nejčastěji používaných látek proti rakovině. Je vysoce účinná proti karcinomu vaječníků, varlat, močového měchýře, hlavy a krku, děložního čípku atd. Terapie vysokými dávkami cisplatiny je často doprovázena vážnými vedlejšími účinky postihujícími ledviny, periferní nervy a vnitřní ucho, což má za následek ukončení léčby nebo snížení dávek cisplatiny.

Renální toxicita vyvolaná léčbou cisplatiny je charakterizována sníženým krevním průtokem a poškozením proximálních tubulů. Intenzivní hydratace v kombinaci s forsírovanou diurézou, přídavek hypertonického solného roztoku a použití chemoprotektivní látky poskytne určitou ochranu před nefrotoxicitou cisplatiny. Většina chemoprotektivních látek na snížení vedlejších účinků cisplatiny obsahuje sulfanylovou skupinu, např. amifostin, diethylthiokarbamát, thiosulfát sodný nebo glutathion. Z těchto látek je nejpoužívanější a celosvětově rozšířený amifostin. Přesný mechanismus nefrotoxicity vyvolané cisplatinou nebyl dosud objasněn. Cisplatina vytváří reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS), superoxidové anionty a hydroxylové radikály, které způsobují oxidativní poškození ledvin. Mitochondrie, ve kterých probíhá endogenní tvorba volných radikálů nejvíce, jsou také zasaženy cisplatinou. Mitochondriální dysfunkce a zvýšené uvolňování volných radikálů přímo přispívají k cytotoxitě cisplatiny. Reaktivní formy kyslíku vyvolávají jednořetězcové zlomy v DNA a postupně dochází k aktivaci jaderné polymerasy polyADP ribosy (poly(ADP-ribose)polymerase, PARP). Ve skutečnosti aktivace PARP byla pozorována i v buňkách léčených cisplatinou. Nadměrná aktivace PARP vede ke spotřebování vlastního substrátu, NAD^+ a následně i ke spotřebě ATP, což má za následek buněčnou smrt. PARP inhibitory mohou předcházet nadměrné aktivaci enzymu a následné energetické krizi a tím chránit buňku. Sloučenina *O*-(3-piperidino-

2-hydroxy-1-propyl)nikotin-amidoxim, **BGP-15**) má PARP inhibiční aktivitu, a proto byl zkoumán jeho nefroprotektivní účinek během léčby cisplatinou a jeho vliv na protinádorové účinky cisplatiny u myší a potkanů.



BGP-15

BGP-15 podávaný v dávkách 100 – 200 mg/kg perorálně krátce před léčbou cisplatinou buď zcela zabránil akutnímu renálnímu selhání vyvolanému cisplatinou, nebo je významně inhiboval. Nefroprotektivní účinek je doprovázený inhibicí nadměrné aktivace PARP cisplatinou a udržením správné hladiny ATP v ledvině. BGP-15 má významný efekt na antioxidační stav ledviny, snižuje množství reaktivních forem kyslíku. Zatímco BGP-15 chrání před nefrotoxicitou vyvolanou cisplatinou, nesnižuje protinádorový účinek této cytostatické látky. Inhibice růstu nádoru cisplatinou je stejná jak s použitím BGP-15, tak bez jeho použití. BGP-15 nemá sulfanylovou skupinu a je novým typem chemoprotektivní sloučeniny. Amifostin je podáván intravenózně, kdežto BGP-15 je aktivní po perorálním podání, což je jeho výhoda [73].

Stejným mechanismem účinku, tzn. PARP inhibicí, chrání BGP-15 srdce před poškozením reperfúzí po ischemické příhodě. Snižuje hladinu reaktivních forem kyslíku a jednořetězcových zlomů DNA a tím i množství poškozených buněk během ischemické reperfúze v srdci [74]. Biro a Katzir studovali kombinaci aminoglykosidů a PARP inhibitorů jako ochranu před nefrotoxicitou vyvolanou aminoglykosidovými antibiotiky [75]. Modulace PARP je také užitečná při ochraně kůže před UV zářením, které způsobuje změny v DNA a následnou aktivaci PARP. Kromě modulace PARP bylo prokázáno, že chrání před slunečním i umělým UV zářením po topické aplikaci, proto by to mohl být nový typ látky, která chrání kůži před UV zářením [76].

Navíc byla látka BGP-15 ve druhé fázi klinického zkoušení podávána jako přípravek mírnící nežádoucí metabolické účinky během léčby olanzapinem, atypickým antipsychotikem. Mezi tyto metabolické účinky patří především nárůst insulinové

rezistence, poruchy hladiny glukosy v krvi (hyperglykémie, diabetes, ketoacidotické kóma, hyperosmolární kóma), obezita. Při současném užívání olanzapinu a BGP-15 dochází ke značné redukci rozvoje insulinové rezistence. Tato látka je novým kandidátem pro mírnění metabolických vedlejších účinků atypických antipsychotik [77].

BGP-15 snižuje nežádoucí a toxické účinky mnoha dalších léčiv. Např. akutní toxicitu acetaminofenu, která způsobuje poškození jaterních buněk [78], snížení nepříznivých psychiatrických vedlejších účinků během léčby nadváhy a obezity antagonisty CB1 kanabinoidních receptorů (např. rimonabantem) [79] a brání nárůstu hmotnosti při současném podávání risperidonu [80].

Látka BGP-15 byla také klinicky testována ke snižování insulinové rezistence. Pacienti byli nediabetici s porušenou glukosovou tolerancí. Užívání BGP-15 vedlo k nárůstu citlivosti k insulinu v celém těle a lepšímu využití glukosy ve srovnání s placebem. Během léčby se nevyskytly žádné nežádoucí účinky a látka byla velmi dobře snášena. V dávkách 200 – 400 mg značně zlepšila citlivost k insulinu u nediabetických insulin-rezistentních pacientů [81].

2.3 Antimikrobiální účinky amidoximů

2.3.1 Antiprotozoální účinky

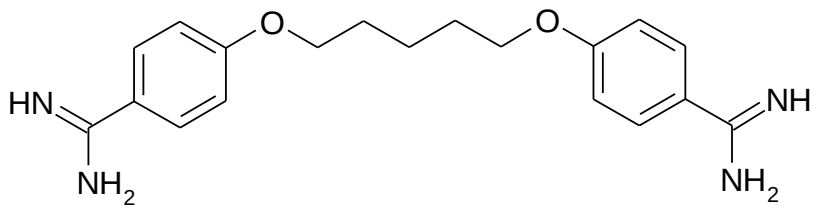
Prvoci způsobují mnoho onemocnění, jako je leishmanióza, malárie, toxoplazmóza, trypanozomóza, známá jako spavá nemoc, v tropických a subtropických zemích [82].

Leishmanióza je jedno z nejzávažnějších parazitických onemocnění rozšířené po celém světě. Je přenášené štípnutím bodavého hmyzu nakaženého bičíkatým prvokem rodu *Leishmania*. Existují tři odlišné formy tohoto onemocnění: viscerální (VL), kožní (CL) a mukokutánní (MCL). Leishmanióza je endemická v 88 zemích, každoročně se objeví 500 000 nových případů a 50 000 úmrtí na viscerální formu leishmaniózy způsobené *Leishmania donovani*. Existuje málo léčiv proti leishmanióze, v první řadě mezi ně patří deriváty pětivalentního antimonu. Jejich nevýhodou je, že jsou špatně snášeny. V několika endemických zemích se navíc objevili antimon-rezistentní

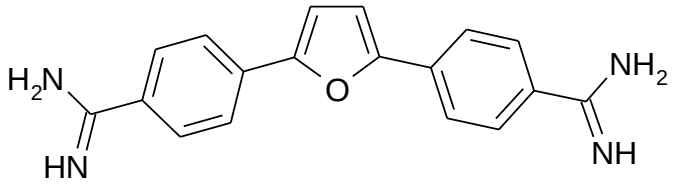
parazité. V případě selhání derivátů antimonu se používají jiná léčiva (amfotericin B, paromomycin, miltefosin) a také **pentamidin** [83]. Kromě leishmaniózy se pentamidin používá k léčbě prvního hemolymfatického stádia trypanozomózy. Navíc je určen k léčbě pneumonie vyvolané *Pneumocystis carinii* u HIV pozitivních pacientů a vykázal účinek vůči *Plasmodium falciparum* in vivo [84].

Pentamidin vykazuje široké antimikrobakteriální spektrum, ale podobně jako jiné amidiny má nízkou biodostupnost po orálním podání. Jak již bylo uvedeno výše, jsou amidiny často používány ve formě proléčiv. Strategie přípravy proléčiv, u kterých je sníženo pK_A funkční skupiny, může poskytnout orálně účinné molekuly. Kromě tvorby amidoximů byl nově uplatněn princip dvojitého proléčiva, kdy je amidoxim ještě esterifikován aminokyselinou (L-valinem). Modelovou sloučeninou tohoto principu je *N*-valoxybenzamidin. Tento princip byl využit i u pentamidinu za vzniku *N*,*N*′-bis(valoxy)pentamidinu, který je hydrolyzován a následně redukován na účinný pentamidin. Aktivace není závislá na enzymech CYP450, ale na esterasach a mARC (enzymový systém redukující amidoximy na amidiny), a proto jsou minimalizovány lékové interakce a vedlejší účinky [84].

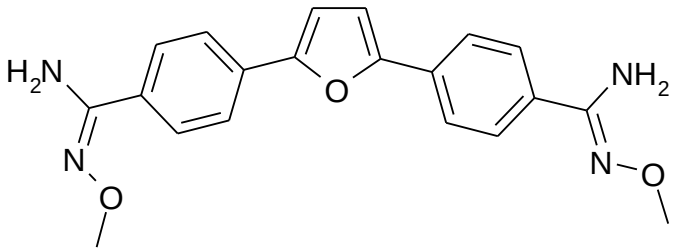
Pentamidin má po intravenózním podání několik toxických vedlejších účinků včetně hypotenze, neutropenie, nauzey a zvracení, dysglykémie a renální a hepatické toxicity. Na pentamidin se můžeme dívat jako na dva benzamidiny spojené alifatickým řetězcem. Některé toxické účinky pentamidinu byly přisuzovány právě alifatickému spojovacímu řetězci. Proto byly připraveny diamidiny spojené heterocyklickým můstkem. Příkladem takového diamidinu je **furamidin** (DB75). Jako profarmaka furamidinu byly studovány *O*-alkoxyamidiny, z nichž nejznámější je **pafuramidin** (DB289). Vývoj obou sloučenin však byl v roce 2008 ukončen, protože vykazovaly nevysvětlenou idiosynkratickou orgánovou toxicitu [84–86].



pentamidin



furamidin



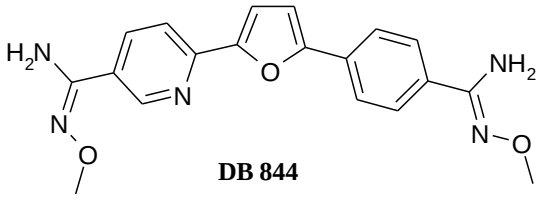
pafuramidin

Při hledání nových antiparazitických sloučenin byly dále připraveny deriváty mono- a diarylamidoximů obsahujících ve své struktuře jiné spojovací můstky, např. 2,3-dihydrofuranový kruh [87], ketosulfonové seskupení [87], imidazo[1,2-*a*]pyridin nebo 5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,2-*a*]pyridin [88]. Studovány jsou také analogy furamidinu, v nichž je jeden z benzenových kruhů nahrazen benzimidazolem nebo naftalenem [89]. Náhradou furanového kruhu těchto derivátů benzenem vznikají aromatické diamidiny s bifenylovým seskupením v molekule [89]. Dalším typem jsou azaanalogy furamidinu obsahující místo benzenových kruhů pyridin [90]. U všech uvedených diamidinů byla zároveň studována také profarmaka typu amidoximů, *O*-alkylamidoximů nebo *O*-acylamidoximů. Uvedené diamidiny a jejich proléčiva působí nejen proti *Leishmania* spp., ale i dalším protozoím.

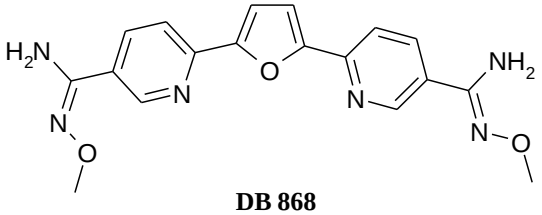
Lidská forma trypanozomózy (neboli spavé nemoci), je způsobena prvokem *Trypanosoma brucei*. Vyskytují se dva poddruhy *T. b. rhodesiense*, která je zodpovědná za akutní formu tohoto onemocnění, a *T. b. gambiense* vyvolávající chronickou formu onemocnění. V průběhu onemocnění se vyskytují dvě stadia, přičemž v prvním stádiu je postižen hemolymfatický systém a ve druhém stadiu je postižen centrální nervový systém. V současnosti dostupná léčiva jsou toxická, mají nebezpečné vedlejší účinky a je zde nutnost parenterálního podání. V prvním stádiu

onemocnění jsou lékem první volby pentamidin a suramin. Léčba druhého stádia nemoci je mnohem obtížnější, protože látky musí překonat hemato-encefalickou bariéru. Mnoho látek vykazujících dobrou aktivitu vůči prvnímu stádiu, ve druhém stádiu selže. V současné době jsou k léčbě druhého stádia používány dva léky, a to melarsoprol a eflornithin [90–94].

Výše uvedený pafuramidin se jako potenciální perorální léčivo trypanozomózy dostal do třetí fáze klinického zkoušení. V roce 2008 byl jeho další vývoj pozastaven kvůli jaterní toxicitě a pozdější renální nedostatečnosti. Navíc bylo zjištěno, že je po perorálním podání nedostatečně účinný v druhém stadiu nemoci. Výhodnější se ukázaly azaderiváty **DB 844** a **DB 868**, testované prozatím pouze na zvířecích modelech. Látka DB 844 vykázala gastrotoxicitu závislou na dávce a proto byl její další výzkum zastaven. U látky DB 868 se neprojevily známky toxicity a zůstala posledním slibným preklinickým kandidátem, který je více tolerován než DB 844 a pafuramidin [90].



DB 844



DB 868

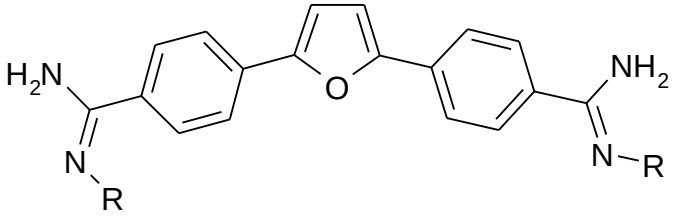
2.3.2 Antifugální účinky amidoximů

Přestože řada amidoximových derivátů byla patentována jako potenciální pesticidy s antifungálním působením [95–98], o jejich účincích vůči původcům mykóz u lidí nejsou k dispozici prakticky žádné údaje. Je však třeba se zmínit o jejich působení na *Pneumocystis* spp. Hlavní zástupce tohoto rodu *Pneumocystis carinii* byl až do konce 80. let 20. století považován za prvoka. Podle současné mikrobiologické klasifikace se řadí mezi houby. Bylo také zjištěno, že druh vyvolávající infekce u lidí se liší od druhů vyvolávajících infekce u jiných živočichů a pro druh infekční pro člověka byl zaveden název *Pneumocystis jiroveci*, přestože se stále vedou diskuse o tom, zda je tento název z formálního hlediska správný a nemá být spíše používán název *P. jirovecii*. *Pneumocystis* je oportunní patogen a vyvolává choroby pouze

u imunokomprimovaných pacientů. Pneumonie způsobená tímto patogenem bývá často označována zkratkou PCP [99]. K léčení tohoto onemocnění nelze použít běžná antimykotika. Jedním z léčiv, která jsou u těchto infekcí účinná, je pentamidin [100, 101].

Ve snaze zvýšit biologickou dostupnost penamidinu bylo připraveno několik látek, z nichž vynikající orální aktivitu proti *Pneumocystis* a redukovanou akutní toxicitu měly bisbenzamidoximové deriváty tří analogů pentamidinu se zkráceným spojovacím řetězcem. Pro svoji chronickou toxicitu a citlivost odpovídajících amidinových sloučenin vůči oxidativnímu metabolismu, se však nezdají být vhodnými kandidáty pro další vývoj. Bylo také zjištěno, že některé amidoximy, především ty, které mají ve spojovacím řetězci dusík a postrádají etherové vazby charakteristické pro pentamidin, mají zanedbatelnou aktivitu jak po intravenózním, tak perorálním podání. Příčinou jejich nízké účinnosti je nedostatečná přeměna na odpovídající amidin. Ta však není způsobena jejich odolností vůči metabolizujícím enzymům, protože při inkubaci s homogenátem jaterní tkáně laboratorních potkanů k přeměně na amidin docházelo. Naopak při inkubaci s intaktními BRL 3A hepatocyty amidin vznikal jen v zanedbatelném množství. Z toho autoři usuzují, že amidoximy jsou na amidiny metabolizovány intracelulárně. Musí tedy nejprve proniknout do buňky, tam jsou redukovány na odpovídající amidin a ten je transportovám zpět do extracelárního prostoru, kde působí na parazita [102].

Furamidin je účinnější a méně toxický než pentamidin vůči *Pneumocystis carinii* v modelu imunosupresovaných myší po intravenózním podání. Pro zlepšení biodostupnosti po orálním podání byly připraveny tři látky: **bisamidoxim furamidinu, bis-*O*-methylamidoxim** a **bis-*O*-ethylamidoxim**. Bis-*O*-ethylamidoxim vykázal pouze okrajovou aktivitu po orálním i intravenózním podání. To je v souladu s výše uvedeným poznatkem, že ne všechny amidoximy mohou fungovat jako proléčiva amidinů. Bis-*O*-methylamidoxim a bis-*O*-ethylamidoxim jsou homology, u nichž nelze očekávat zásadní rozdíl při pasivním transportu do buněk. Je tedy pravděpodobné, že buď enzymy podílející se na jejich transportu nebo reduktasy nutné pro jejich přeměnu na amidin jsou strukturálně specifické [103]. V další studii pak bylo zjištěno, že konverze 2,8-dibenzofurandiamidoximů probíhá v intaktních buňkách pomaleji než přeměna pentamidoximu na pentamidin [104].



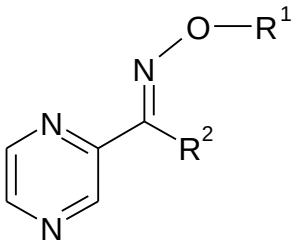
bisamidoxim furamidinu R= OH
bis-*O*-methylamidoxim R = OCH_3
bis-*O*-ethylamidoxim R = OCH_2CH_3

Pro antimikrobiální aktivitu pentamidinu a jeho analogů je důležitá také schopnost vázat se na DNA. Ta je závislá jak na charakteru spojovacího řetězce, tak na poloze amidinových skupin vzhledem k heteroatomu ve spojovacím řetězci [104, 105].

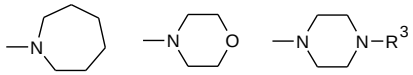
2.3.3 Antibakteriální účinnost amidoximů

Kvůli nárůstu rezistence patogenních mikroorganizmů je potřeba nalézat nová antibakteriální léčiva s vylepšenými vlastnostmi, hlavně vyšší aktivitou vůči multidrug-rezistentním (MDR) kmenům a se sníženou toxicitou.

Pyrazinamid je jedna z nejúčinnějších látek proti tuberkulóze. Různé pyrazinové deriváty a pyrazinamidové analogy také vykazují vysokou antibakteriální aktivitu. Gobis se spolupracovníky [106, 107] připravili sérii analogů ***N´*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu** a zjišťovali jejich antibakteriální a antimykobakteriální aktivitu *in vitro*. Mezi 19 deriváty jich 9 vykazovalo aktivitu vůči anaerobním kmenům a 8 z nich bylo aktivní na grampozitivní kmeny (*Peptostreptococcus, Actinomyces, Propionibacterium*). Jen 3 z 19 testovaných sloučenin vykázaly aktivitu proti aerobním kmenům. Antimykobakteriální aktivita těchto derivátů byla nízká.



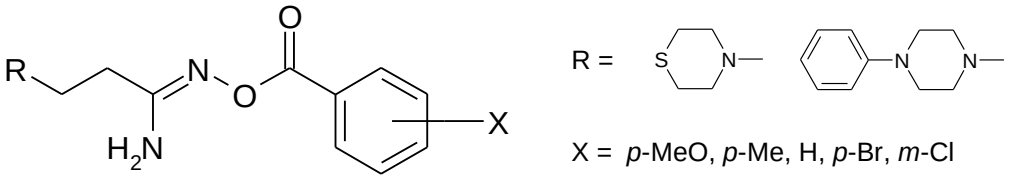
R^1 = H, CH_3

R^2 = NH_2, Cl, 

kde R^3 = methyl, (subst.)fenyl, 2-pyridyl, benzyl aj.

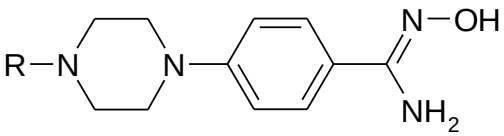
analogy *N´*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu

V rámci výzkumu nových potenciálních antituberkulotik byly studovány také **β-amino-*O*-aroyl-propioamidoximy** [108–111]. *O*-aroyl-β-(4-fenylpiperazin-1-yl)-propioamidoximy vykázaly zajímavé antituberkulotické vlastnosti proti senzitivním, rezistentním i multidrug-rezistentním kmenům *M. tuberculosis in vitro* [111].



β-amino-*O*-aroyl-propioamidoximy

Antibakteriální a antimykobakteriální účinnost byla zjištěna také u derivátů ***N´*-hydroxy-4-(piperazin-1-yl)benzenkarboximidamidu**. Tyto amidoximy vykázaly vysokou antibakteriální aktivitu proti anaerobním bakteriím, ale byly neaktivní vůči aerobům. Antimykobakterální minimální inhibiční koncentrace (MIC) vůči standardnímu kmeni $H_{37}Rv$ a dvěma kmenům získaným od tuberkulózních pacientů byly v rozmezí 12,5 – 100 μg/ml [112].



R = H, CH_3, C_6H_5, 4-F-C_6H_4, $C_6H_5CH_2$

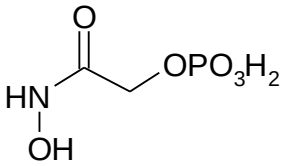
deriváty *N´*-hydroxy-4-(piperazin-1-yl)benzenkarboximidamidu

Dalšími novými potenciálními antibakteriálními látkami by mohly být selektivní inhibitory fruktosabisfosfátaldolasy třídy II. Fruktosabisfosfátaldolasa (FBP-aldolasa) katalyzuje reverzibilní štěpení fruktoso-1,6-bisfosfátu na dihydroxyaceton-fosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. V živých organismech existují dvě hlavní třídy (I, II) tohoto enzymu, které se zásadně liší ve své struktuře. Aldolasu třídy II najdeme pouze u mikroorganismů (bakterie, kvasinky, *Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis, M. pneumoniae, Candida albicans*, atd.), zatímco aldolasa třídy I se

nachází u savců. Ačkoliv tyto dvě třídy katalyzují stejnou reakci se stejnou stereospecifitou, působí odlišným mechanismem účinku.

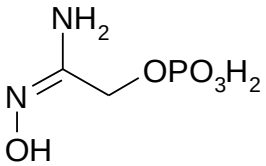
Mutace genu kódujícího FBP-aldolasu u *E. coli* způsobila hrubé narušení metabolismu a zpomalení růstu bakterie. Při pokusech na zmutovaných bakteriích rodu *Streptomyces* bylo zjištěno, že absence FBP-aldolasy třídy II může být pro tyto druhy smrtelná. A proto dobré selektivní inhibitory aldolasy třídy II jsou novými potenciálními antibiotiky.

Zatímco byly připraveny a testovány desítky inhibitorů aldolasy třídy I, existuje pouze jeden dobrý inhibitor třídy II – **kyselina fosfoglykolhydroxamová** (PGH). Fosfoglykolhydroxamová kyselina je významný kompetitivní inhibitor kvasinkové aldolasy třídy II, ale mnohem méně inhibuje savčí aldolasu třídy I.

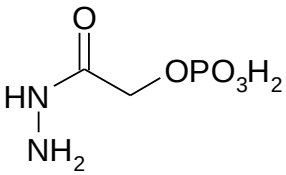


kyselina fosfoglykolhydroxamová

Byly připraveny **fosfoglykolamidoxim** (PGA) a **fosfoglykolhydrazid** (PGHz), dva produkty, které zatím nebyly popsány v literatuře. Oba byly testovány jako inhibitory aldolasy třídy II (z kvasinky a z *Bacillus subtilis*) a aldolasy třídy I (ze svalů králíka).



fosfoglykolamidoxim

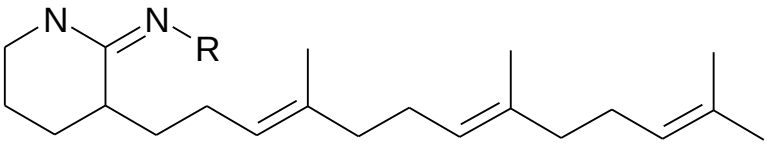


fosfoglykolhydrazid

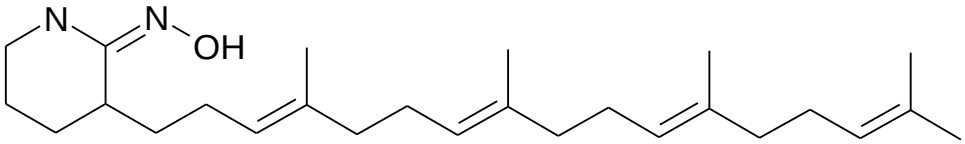
Fosfoglykolamidoxim se choval jako kompetitivní inhibitor FBP-aldolasy třídy II u obou druhů, avšak žádná inhibice nebyla naměřena u svalu králíka do koncentrace 1 mmol/l. Podobné výsledky vyšly i u fosfoglygokolhydrazidu. Obě testované sloučeniny dosáhly slušných výsledků, ale ani jedna nebyla efektivnější než fosfoglykolhydroxamová kyselina. Přestože obě látky měly nižší aktivitu než

fosfoglykolhydroxamová kyselina, ukázaly lepší selektivitu k aldolase třídy II, a proto by mohly přispět k rozvoji nové třídy antimikrobiálních látek [113].

Další možnost zásahu do bakteriální buňky je v místě bakteriální membrány. Je složena z pentacyklických triterpenů, které mají funkci stabilizační, stejně jako membránové steroly. Tyto terpeny vznikají cyklizací skvalenu katalyzovanou enzymem skvalen-hopencyklasou (SHC). Jako potenciální inhibitory skvalen-hopencyklasy byly připraveny **trienylamidrazon**, **trienylamidoxim** a **tetraenylamidoxim**, které odpovídají částečně cyklizovanému řetězci skvalenu.



trienylamidrazon R = NH_2
trienylamidoxim R = OH



tetraenylamidoxim

Všechny 3 sloučeniny vykázaly značnou míru inhibice, avšak nejúčinnější byl tetraenylamidoxim. Amidoximy byly odolnější vůči působení hydrolas než amidrazon. Všechny sloučeniny působí jako nekompetitivní inhibitory skvalen-hopen cyklasy. SHC působí optimálně při pH 6, přičemž amidrazon se nachází při tomto pH v protonované formě a amidoximy převážně v neprotonované. Vyšší účinnost amidoximů naznačuje, že se inhibitory na SHC vážou převážně v neprotonované podobě [114].

3 METODICKÁ ČÁST

3.1 Možnosti přípravy amidoximů

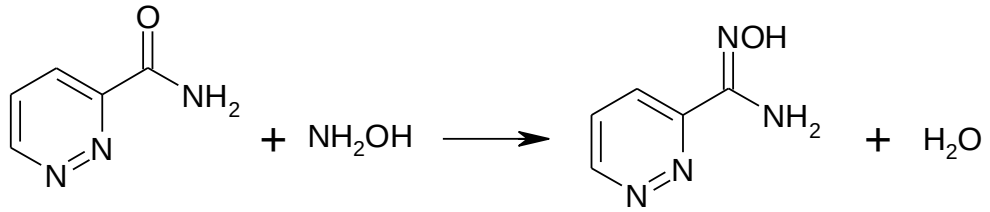
3.1.1 Příprava reakcí nitrilu s hydroxylaminem

$$RCN + NH_2OH \longrightarrow RC(=NOH)NH_2$$

Tato reakce byla použita Tiemannem a Krügerem již v roce 1884 [115, 116] a je dosud nejpoužívanější metodou pro přípravu amidoximů [117]. Spočívá v uvolňování hydroxylaminu z jeho hydrochloridu za použití uhličitanu sodného, přidání nitrilu a alkoholu. Směs se vaří při 60 – 80 °C několik hodin. Kromě uhličitanu sodného lze použít i hydroxid sodný, hydroxid draselný nebo ethoxid sodný. Provede-li se reakce s volným hydroxylaminem v absolutním methanolu nebo ethanolu, není nutné odstraňovat z reakční směsi anorganickou sůl [32, 117, 118].

3.1.2 Příprava reakcí amidů a thioamidů s hydroxylaminem

Hydroxylamin většinou s amidy nereaguje. Pouze v několika případech se podařilo takto získat amidoxim [117]. Úspěšně byla tato metoda použita například pro přípravu pyridazin-3-amidoximu [118].



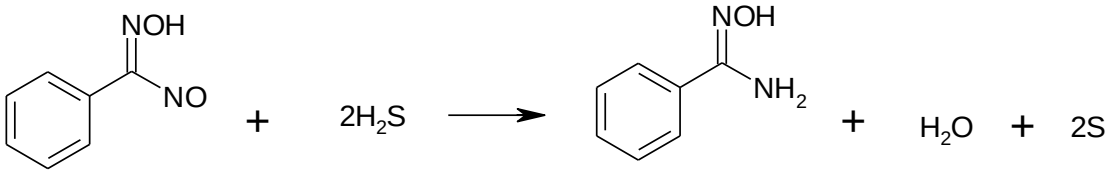
Některé aromatické amidoximy byly připraveny působením hydroxylaminu na thioamidy.

$$ArC(S)NH_2 + NH_2OH \longrightarrow ArC(=NOH)NH_2 + H_2S$$

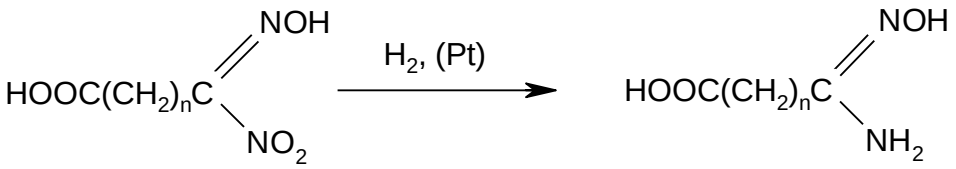
Při použití thioamidu jako výchozí látky funguje metoda na stejném principu jako předchozího použití nitrilu, tzn. uvolnění hydroxylaminu z hydrochloridu za použití

vodného roztoku uhličitanu sodného, a využívá se v případě, že je jednodušší jako výchozí látku získat thioamid než odpovídající nitril [117].

3.1.3 Příprava redukcí kyseliny nitrosolové a nitrolové

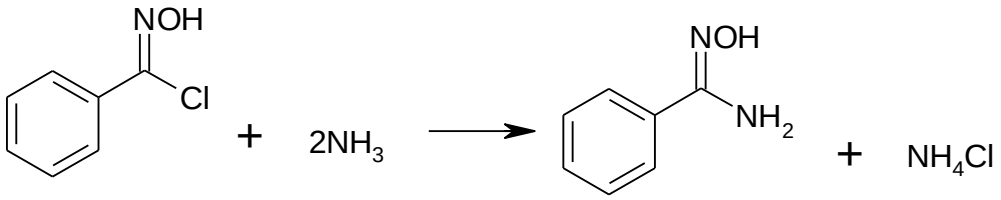


Redukcí nitrosolové kyseliny pomocí hydrogensulfidu byl připraven benzamidoxim.

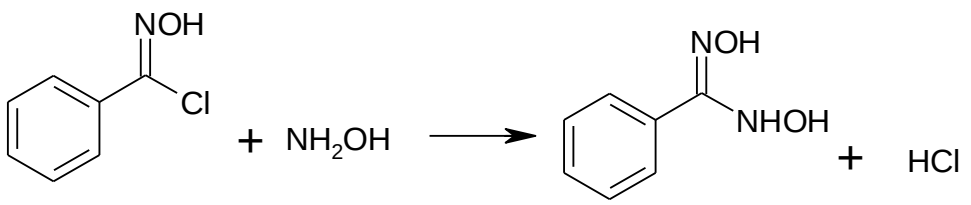


V poslední době je hlavní metodou přípravy monoamidoximů dikarboxylových kyselin katalytická redukce nitrolové kyseliny. Touto metodou byl připraven adipomonoamidoxim [117].

3.1.4 Příprava reakcí chloridu hydroximové kyseliny s amoniakem



Chloridy hydroximových kyselin se získávají přímou chlorací aldoximů. Jejich reakcí s amoniakem lze pak snadno získat amidoximy. Touto metodou byly připraveny benzamidoxim, *o*-chlorbenzamidoxim, tereftalbenzamidoxim.



Chloridy kyselin hydroximových reagují i s hydroxylaminem za vzniku oxyamidoximů. Tyto sloučeniny se redukují oxidem siřičitým na příslušné amidoximy [117].

3.1.5 Příprava reakcí hydroxylaminu s iminoethery a hydrochloridy amidinů

Tyto metody byly sice v minulosti několikrát použity, ale mají malý praktický význam, protože výchozí iminoethery a amidiny se získávají z odpovídajících nitrilů, z nichž je možné získat amidoximy přímo reakcí s hydroxylaminem [117].

3.1.6 Další metody přípravy amidoximů

Amidoximy je možno získat také aldolovou kondenzací formamidoximu s aromatickými aldehydy [117] nebo štěpením oxadiazolového kruhu [119]. Katritzky a kol. [119] získali různé amidoximy reakcí imidoylbenzotriazolů s hydroxylamin-hydrochloridem v triethylaminu za použití mikrovlného záření. Reakce trvala 5 – 15 minut a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 65 – 81 % [119]. Pokroky v syntéze a využití amidoximů byly nedávno shrnuty v práci čínských autorů. Detaily jsou však nedostupné, protože práce byla publikována v čínštině [120].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemická část

Při přípravě byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny:

- Pyrazin-2-karbonitril (99%, Aldrich)
- Kyselina máselná (99%, Fluka)
- Kyselina isomáselná (99%, Aldrich)
- Kyselina hexanová (98%, Acros Organics)
- Kyselina heptanová (≥98%, Fluka)
- Hydroxylamin-hydrochlorid

TLC chromatografie byla prováděna na Silufolu UV 254 (Kavalier Votice). Jako mobilní fáze byla používána směs benzín + etyl-acetát 80:20 (v/v).

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

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku Böetia a nebyly korigovány.

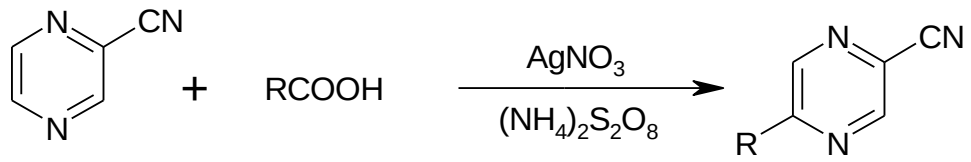
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

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

^{1}H-NMR (299.95 MHz) a ^{13}C-NMR (75.43 MHz) spektra byla měřena na přístroji VARIAN Mercury-VxBB 300 v DMSO-d_6. Chemické posuny byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (2.49 pro ^{1}H, 39.7 pro ^{13}C). Chemické posuny jsou uváděny v δ, ppm a interakční konstanty J v Hz.

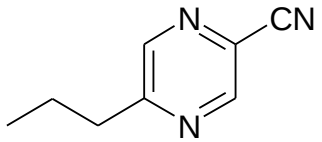
4.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

Obecný postup:



10,5 g (0,1 mol) pyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 300 ml vody zahřáté na 80 ºC. K tomuto roztoku bylo přidáno 1,7 g (0,01 mol) dusičnanu stříbrného a příslušná kyselina (0,1 mol). Za míchání byl přikapán roztok 25,1 g peroxodisíranu amonného (0,08 mol) v 70 ml vody. Teplota byla udržována v rozmezí 75 – 80 ºC a směs byla hodinu míchána. Zchladlá směs byla poté zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného na pH 9 – 10 a kontinuálně extrahována etherem. Etherový výtřepek byl vysušen bezvodým síranem sodným a podroben dělení na sloupci za použití soustavy lékařský benzín + ethyl-acetát v poměru 8:2. Objem frakce byl 100 ml.

4.1.1.1 *5-propylpyrazin-2-karbonitril*



Při přípravě bylo použito 8,80 g kyseliny máselné

Při sloupcové chromatografii byl použit silikagel 60 Fluka (0,063 – 0,2 mm), 500 g

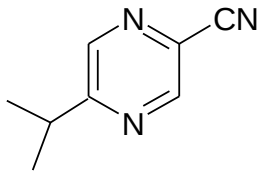
Sumární vzorec: $C_8H_9N_3$

Molekulová hmotnost: 147,18

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek: 5,51 g (37,4 %)

4.1.1.2 *5-isopropylpyrazin-2-karbonitril*



Při přípravě bylo použito 8,80 g kyseliny isomáselné

Při sloupcové chromatografii byl použit silikagel 60 Fluka (0,063 – 0,2 mm), 500 g

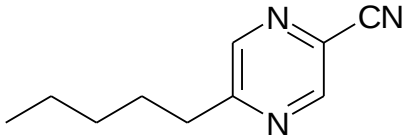
Sumární vzorec: $C_8H_9N_3$

Molekulová hmotnost: 147,18

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek: 7,38 g (50 %)

4.1.1.3 *5-pentylpyrazin-2-karbonitril*



Při přípravě bylo použito 11,6 g kyseliny hexanové

Sloupcová chromatografie byla provedena 2×, při první chromatografii byl použit silikagel 60 Fluka (0,063 – 0,2 mm), 500 g a při druhé silikagel Merck (0,040 – 0,063 mm), 400 g

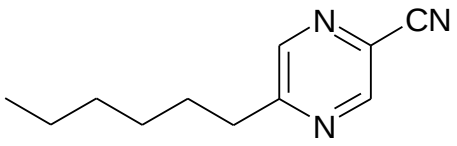
Sumární vzorec: $C_{10}H_{13}N_3$

Molekulová hmotnost: 175,24

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek: 6,45 g (37 %)

4.1.1.4 *5-hexylpyrazin-2-karbonitril*



Při přípravě bylo použito 13,0 g kyseliny heptanové

Sloupcová chromatografie byla provedena 3× za použití silikagelu Merck (0,040 – 0,063 mm), 500 g

Sumární vzorec: $C_{11}H_{15}N_3$

Molekulová hmotnost: 189,26

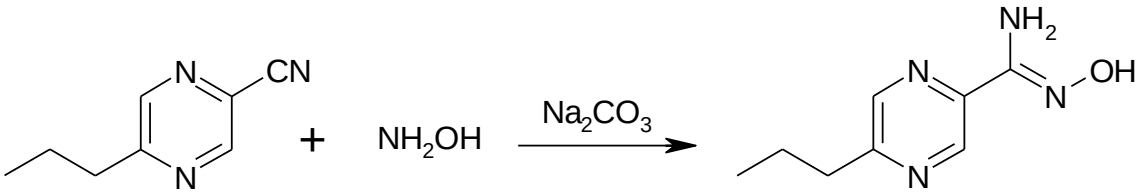
Vzhled: Nažloutlá kapalná látka

Výtěžek: 2,5 g (13 %)

Identita všech látek byla ověřena pomocí TLC podle dříve připraveného standardu [22, 23].

4.1.2 Příprava N´-hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů

4.1.2.1 *N´-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid*



5,51 g (0,04 mol) 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 6 ml ethanolu. 5,56 g (0,08 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 6 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-propylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 8,48 g (0,08 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 50 ml vody a opatrně přidáno ke

směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Po vysušení bylo získáno 4,58 g (68 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalizována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 180,21

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 158 – 164 °C

Elementární analýza:

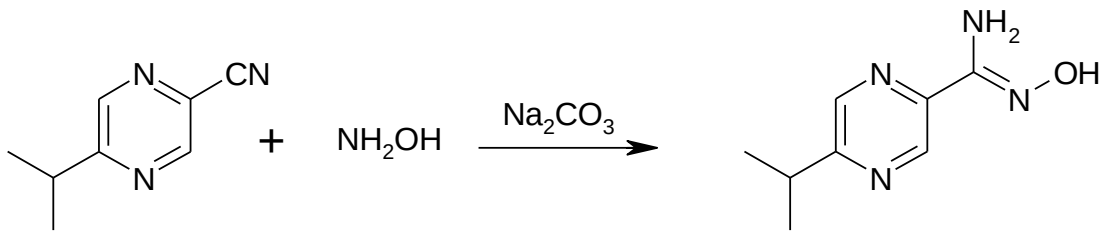
	% C	% H	% N
Vypočteno:	53,32	6,71	31,09
Nalezeno:	53,38	7,23	31,26

IČ spektrum: 3434 (OH), 3297 (NH), 2957, 2932, 2871 (CH), 1678, 1661 (C-N=O), 944 (C=N-OH)

^{1}H NMR spektrum (500 MHz) δ 10,11 (1H, s, OH); 8,96 (1H, s, H3); 8,50 (1H, s, H6); 5,90 (2H, bs, NH_2); 2,76 (2H, t, J = 7.3 Hz, CH_2); 1,77 − 1,64 (2H, m, CH_2); 0,90 (3H, t, J = 7.3 Hz, CH_3)

^{13}C NMR spektrum (125 MHz) δ 156,8; 148,5; 143,5; 142,3; 140,8; 36,4; 22,2; 13,7

4.1.2.2 *N´-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamid*



7,38 g (0,05 mol) 5-isopropylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 7,5 ml ethanolu. 6,95 g (0,10 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 7,5 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-isopropylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 10,6 g (0,10 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 62,5 ml vody

a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Po vysušení bylo získáno 7,37 g (76,6 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalizována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 180,21

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 164 – 166°C

Elementární analýza:

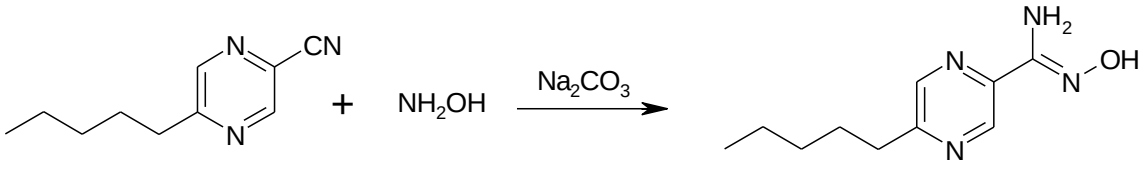
	% C	% H	% N
Vypočteno:	53,32	6,71	31,09
Nalezeno:	53,34	6,98	31,37

IČ spektrum: 3430 (OH), 3299 (NH), 2970, 2867 (CH), 1660 (C-N=O), 941 (C=N-OH)

1H NMR spektrum (300 MHz)) δ 10,11 (1H, s, OH); 8,95 (1H, s, H3); 8,49 (1H, s, H6); 5,90 (2H, bs, NH_2); 2,75 (2H, t, J = 7.5 Hz, CH_2); 1,78 − 1.61 (2H, m, CH_2); 0,89 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH_3)

^{13}C NMR spektrum (75 MHz) δ 156,8; 148,5; 143,5; 142,3; 140,8; 36,4; 22,2; 13,7

4.1.2.3 *N´-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karboximidamid*



6,45 g (0,03 mol) 5-pentylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 4,5 ml ethanolu. 4,17 g (0,06 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 4,5 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-pentylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 6,36 g (0,10 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 37,5 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným

chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Po vysušení bylo získáno 5,28 g (68,9 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalizována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 208,26

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 150 – 158°C

Elementární analýza:

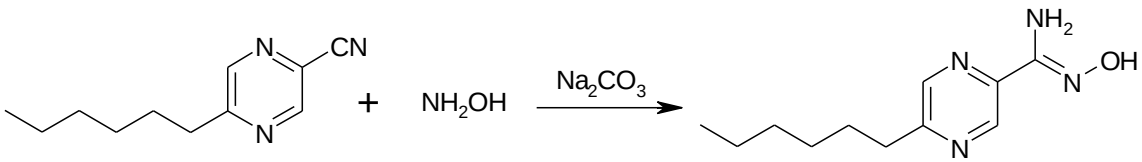
	% C	% H	% N
Vypočteno:	57,67	7,74	26,90
Nalezeno:	57,60	8,04	27,15

IČ spektrum: 3436 (OH), 3297 (NH), 2952, 2927, 2858 (CH), 1678, 1660 (C-N=O), 942 (C=N-OH)

^{1}H NMR (500 MHz) δ 10,11 (1H, s, OH); 8,96 (1H, s, H3); 8,50 (1H, s, H6); 5,90 (2H, bs, NH_2); 2,77 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH_2); 1,74 − 1.61 (2H, m, CH_2); 1,36 − 1.21 (4H, m, CH_2); 0,85 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH_3)

^{13}C NMR (125 MHz) δ 157,0; 148,5; 143,4; 142,3; 140,8; 34,4; 31,0; 28,6; 22,1; 14,0

4.1.2.4 *N´-hydroxy-5-hexylpyrazin-2-karboximidamid*



2,5 g (0,01 mol) 5-hexylpyrazin-2-karbonitrilu bylo rozpuštěno v 1,5 ml ethanolu. 1,39 g (0,02 mol) hydroxylamin-hydrochloridu bylo rozpuštěno v 1,5 ml vody a přidáno k ethanolickému roztoku 5-hexylpyrazin-2-karbonitrilu. Oddělily se dvě fáze. 2,12 g (0,02 mol) uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v 12,5 ml vody a opatrně přidáno ke směsi. Celá směs byla vařena 5 hodin při 70 °C pod zpětným chladičem. Po zchladnutí byly vyloučené krystaly odsáty a promyty vodou. Po vysušení bylo získáno

2,10 g (71,6 %) surového produktu. Pro analýzu byla sloučenina překrystalizována z bezvodého ethanolu.

Molekulová hmotnost: 222,15

Vzhled: bílá krystalická látka

Teplota tání: 149 – 151 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno:	59,44	8,16	25,20
Nalezeno:	59,70	8,33	25,66

IČ spektrum: 3430 (OH), 3179 (NH), 2953, 2925, 2857 (CH), 1661 (C-N=O), 946 (C=N-OH)

^{1}H NMR (500 MHz) δ 10,11 (1H, s, OH); 8,96 (1H, s, H3); 8,50 (1H, s, H6); 5,90 (2H, bs, NH_2); 2,78 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, CH_2); 1,73 − 1,61 (2H, m, CH_2); 1,34 − 1,20 (6H, m, CH_2); 0,84 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, CH_3)

^{13}C NMR (125 MHz) δ 157,0; 148,5; 143,4; 142,3; 140,8; 34,4; 31,2; 28,8; 28,4; 22,2; 14,1

4.2 Biologická část

4.2.1. Testované sloučeniny

N′-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid = 4.1.2.1

N′-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamid = 4.1.2.2

N′-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karboximidamid = 4.1.2.3

N′-hydroxy-5-hexylpyrazin-2-karboximidamid = 4.1.2.4

4.2.2 Hodnocení antifungální aktivity

Citlivost fungálních kmenů na připravené látky byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou [121]. Použité kmeny zahrnovaly *Candida albicans* ATCC 44859 (**CA**) ze sbírky American typeCulture Collection, Manassas, VA a klinické izoláty získané z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové – *Candida tropicalis* 156 (**CT**), *Candida krusei* E 28 (**CK**), *Candida glabrata* 20/I (**CG**), *Trichosporon asahii* 1188 (**TA**), *Aspergillus fumigatus* 231 (**AF**), *Absidia corymbifera* 272 (**AC**) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (**TB**). Kmeny byly uchovávány na Sabouraudově dextrosovém agaru (SDA, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při 4 °C. Před testováním byl každý kmen pasážován na SDA a inokula byla připravena suspendováním kvasinek, konidií nebo sporangiospor ve sterilním 0,85% fyziologickém roztoku. Hustota buněk byla pomocí Bürkerovy komůrky upravena tak, aby zásobní suspenze obsahovala $(1{,}0 \pm 0.2) \times 10^5$ CFU/ml. Konečné inokulum bylo připraveno zředěním zásobní suspenze testovacím médiem v poměru 1:20.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Jejich antifungální aktivita pak byla stanovena v tkáňovém kultivačním mediu RPMI 1640 (Sevapharma, Praha), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,165M 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonové kyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Kontroly obsahovaly pouze medium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu byla max. 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst hub. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), definované jako koncentrace vyvolávající 80% (u vláknitých hub 50%) inhibici růstu ve srovnání s kontrolami, byly odečteny po 24 a 48 hodinách (v případě *T. mentagrophytes* po 72 a 120 hodinách) statické kultivace při teplotě 35 °C.

Fluconazol (Pfizer, New York, NY) a amfotericin B (Sigma-Aldrich) byly použity jako standardní antimykotika. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Antifungální aktivita připravených sloučenin

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC**					
		4.1.2.1	***4.1.2.2***	***4.1.2.3.***	***4.1.2.4.***	***AMP-B***	***FLU***
CA	*24h*	>500	>500	>500	>500	0,002	0,82
	48h	>500	>500	>500	>500	0,068	1,63
CT	*24h*	>500	>500	>500	>500	0,068	1,63
	48h	>500	>500	>500	>500	0,068	> 417,90
CK	*24h*	>500	>500	>500	>500	0,135	52,24
	48h	>500	>500	>500	>500	0,135	104,47
CG	*24h*	>500	>500	>500	>500	0,034	13,06
	48h	>500	>500	>500	>500	0,135	52,24
TA	*24h*	>500	>500	>500	>500	1,082	3,26
	48h	>500	>500	>500	>500	2,164	6,53
AF	*24h*	>500	>500	>500	>500	0,271	> 417,90
	48h	>500	>500	>500	>500	0,135	> 417,90
AC	*24h*	>500	>500	>500	>500	1,082	> 417,90
	48h	>500	>500	>500	>500	2,164	> 417,90
TM	*72h*	>500	>500	>500	>500	1,082	26,12
	120h	>500	>500	>500	>500	1,082	52,24

4.2.3 Hodnocení antibakteriální aktivity

Citlivost bakteriálních kmenů vůči studovaným sloučeninám byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou [122]. Použité kmeny (*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 – **SA**, *Escherichia coli* CCM 4517 – **EC**, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 – **PA**) byly z České sbírky mikroorganismů (CCM, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno). Tyto kmeny jsou doporučeny jako standardní pro testování antibakteriálních účinků. Ostatní kmeny (*Staphylococcus aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní – MRSA, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 – **SE**, *Enterococcus sp.* J 14365/08 – **EF**, *Klebsiella pneumoniae* D11750/08 – **KP**, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní – **KP-E)** jsou klinické izoláty (Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta, Hradec Králové).

Kmeny byly kultivovány na Müller-Hintonově agaru (MHA, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při 35 °C a uchovávány na stejném mediu při 4 °C. Před testováním byl každý kmen pasážován na MHA. Bakteriální inokula byla připravena suspendováním ve sterilním fyziologickém roztoku (0.85%). Hustota suspenze byla pomocí densitometru nastavena na 0,5 stupně McFarlandovy škály tj., $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Jejich antibakteriální aktivita pak byla stanovena v Müller-Hintonově bujónu (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), jehož pH bylo 7,0. Kontroly obsahovaly pouze medium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovacím mediu byla max. 1 % (v/v) a neovlivňovala přirozený růst bakterií. Minimální inhibiční koncentrace (MIC), definované jako koncentrace vyvolávající 95% inhibici růstu ve srovnání s kontrolami, byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické kultivace při teplotě 35 °C. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Antibakteriální aktivita připravených sloučenin

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA – MIC/IC_{95}** (μmol/l)			
		4.1.2.1	***4.1.2.2***	***4.1.2.3.***	***4.1.2.4.***
SA	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
MRSA	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
SE	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
EF	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
EC	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
KP-E	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500
PA	*24h*	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500

5 DISKUSE

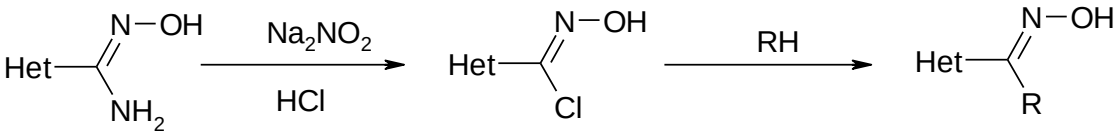
Úkolem mé diplomové práce byla příprava a charakterizace amidoximů odvozených od 5-alkylpyrazin-2-karbonitrilů. Výchozí nitrily jsem připravovala postupem, který je na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv používán již řadu let [22, 23]. Tato část práce byla časově velmi náročná, protože při homolytické alkylaci vzniká směs výchozího pyrazin-2-karbonitrilu a polohových izomerů, z níž je nutné oddělovat požadovaný 5-alkylderivát opakovanou sloupcovou chromatografií.

Při syntéze *N´*-hydroxy-5-alkylpyrazin-2-karboximidamidů jsem vycházela z práce amerických autorů [34], kteří po izolaci hlavního podílu krystalů *N´*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu, získávali zbývající produkt extrakcí vodného matečného louhu ethyl-acetátem. V případě alkylovaných sloučenin však přechází do ethyl-acetátu také výchozí nitril a znečišťuje produkt. Proto jsem tuto část vynechávala. Výtěžky po izolaci hlavního podílu produktu byly kolem 70 %. Všechny amidoximy připravené v mé diplomové práci jsou nové, v literatuře dosud nepopsané sloučeniny. Jejich struktury byly potvrzeny IČ, ^{1}H a ^{13}C NMR spektry a čistota potvrzena elementární analýzou.

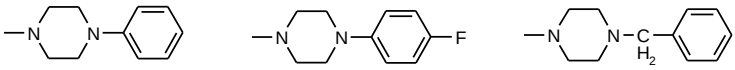
Získané amidoximy byly na katedře Biologických a lékařských věd testovány na antifungální a antibakteriální účinnost, avšak žádný nevykázal antimikrobní působení. To je patrně dáno skutečností, že v testech *in vitro* nedochází k jejich aktivaci na odpovídající amidiny. V dalším výzkumu těchto sloučenin proto bude vhodné připravit analogické amidinové deriváty a zjistit jejich antimikrobní účinnost, případně otestovat amidoximy *in vivo*.

Amidiny je možné připravit redukcí odpovídajících amidoximů v přítomnosti Raneyova niklu nebo elektrolytickou redukcí v kyselině chlorovodíkové [117]. Lze je však získat i přímo reakcí z odpovídajících nitrilů [1, 123, 124] nebo esterů [125]. Z časových důvodů jsem však nestačila přípravu amidinů experimentálně vyzkoušet.

I v případě, že by u amidoximů nebyla zjištěna žádná zajímavá biologická aktivita, je možné je využít jako meziprodukty pro syntézu dalších organických sloučenin, např. solí a organických komplexů, *O*-substituovaných, *N*-substituovaných derivátů [117] a 1,2,4-oxadiazolů [16, 34, 107, 112, 117]. Převedením amidoximů na *N*-hydroxypyrazin nebo *N*-hydroxypyridinkarboximidoyl-chloridy získali polští autoři [106, 107] reaktivní intermediáty pro další syntézy.



Het = pyrazin, pyridin

R = 

aj.

6 ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem připravila čtyři v literatuře popsané 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily, z nichž jsem reakcí s hydroxylamin-hydrochloridem v bazickém prostředí získala čtyři v literatuře dosud nepopdané amidoximy

- *N*′-hydroxy-5-propylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*′-hydroxy-5-isopropylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*′-hydroxy-5-pentylpyrazin-2-karboximidamid
- *N*′-hydroxy-5-hexylpyrazin-2-karboximidamid

Získané amidoximy byly na testovány na antifungální a antibakteriální účinnost, avšak žádný nevykázal antimikrobní působení.

7 LITERATURA

1. KUSHNER, S.; DALALIAN, H.; SANJURJO, J. L.; BACH, F. L., Jr., SAFIR, S. R., SMITH, V. K., Jr; WILLIAMS, J. H. Experimental therapy of tuberculosis. II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617–3621.
2. COTE, L.; OLESON, J. J.; WILLIAMS, J. H. Nicotinamide antagonists. *Exp. Med. Surg.* **1953**, *11*, 96–102.
3. SMITH, V. K., Jr.; KUSHNER, S. Pyrazine derivatives and method of preparing the same. US 2677686, May 4, 1954 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=2677686A&KC=A&FT=D&date=19540504&DB=EPODOC&locale=en_EP
4. KARMAS, G.; SPOERRI, P. E. 2-Bromopyrazines, 2-cyanopyrazines, and their derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2141–2144.
5. DELABY, R.; DAMIENS, R.; ROBBA, M. Sur quelques derives fonctionnels de la pyrazine. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci*. **1958**, *247*, 822–824.
6. ALBERT, A.; OTA, K. Pteridine studies. XLI. New routes to 4-aminopteridines vis 3-(dimethylaminomethyleneamino)pyrazine-2-carbonitrile and related compounds. *J. Chem. Soc. Perkin 1*. **1971**, *22*, 3727–3730.
7. FOKS, H.; JANOWIEC, M. Pyrazine derivatives. XIV. Synthesis and tuberculostatic activity of pyrazine amidrazones. *Acta. Pol. Pharm.* **1979**, *36*, 155–160.
8. SHIMIDZU, S.; SHOJI, T.; ABE, N.; DOBA, M.; TAGURO, A.; IGUCHI, A.; NAKAISHI, T. Process for preparing heteroaromatic nitriles useful as starting materials for preparation of medicines and agricultural chemicals. EP 253360, Jan 20, 1987 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=EP&NR=0253360A2&KC=A2&FT=D&date=19880120&DB=EPODOC&locale=en_EP
9. DLABAL, K.; PALÁT, K.; LYČKA, A.; ODLEROVÁ, Ž. Synthesis and proton and carbon-13 NMR spectra of sulfur derivatives of 2-chloropyrazine and 6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile. Tuberculostatic avtivity. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, *55*, 2493–2501.
10. NAKAJIMA, T.; IZAWA, T.; KASHIWABARA, T.; NAKAJIMA, S.; MUNEZUKA, Y. Cyanoamidines. I. Synthesis and vasodilatory activity of *N*-substituted heteroaromatic cyanoamidines. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2475–2482.
11. RANFT, D.; LEHWARK-YVETOT, G.; SCHAPER, K. J.; BUGE, A. N^1-Hetaryl-substituted pyridine- and pyrazinecarboxamidrazones with antimycobacterial activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1997**, *330*, 169–172.
12. DEMKO, Z. P.; SHARPLESS, K. B. Preparation of 5-substituted 1*H*-tetrazoles from nitriles in water. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7945–7950.
13. FUCHIGAMI, T.; WAKASA, N. Method for manufacturing of aminomethylpyrazine by hydrogenation of cyanopyrazines. JP 2001089459, Apr 3, 2001 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL:

http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=JP&NR=2001089459A&KC=A&FT=D&date=20010403&DB=EPODOC&locale=en_EP

14. SONDHI, S. M.; DINODIA, M.; KUMAR, A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4657–4663.
15. COMBS, A. Amidinoheterocycles as modulators of indoleamime 2,3-dioxygenase. WO 2008036643, March, 27, 2008 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2008036643A2&KC=A2&FT=D&date=20080327&DB=EPODOC&locale=en_EP
16. GRANT, D.; DAHL, R.; COSFORD, N. D. P. Rapid multistep synthesis of 1,2,4-oxadiazoles in a single continuous microreactor sequence. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7219–7223.
17. STIPPICH, K.; WEISS, D.; GUETHER, A.; GÖRLS, H.; BECKERT, R. Novel luminescence dyes and ligands based on 4-hydroxythiazole. *J. Sulfur Chem.* **2009**, *30*, 109–118.
18. SHIN, J. W.; HAN, J. H.; KIM, B. G.; JANG, S. H.; LEE, S. G.; MIN, K. S. Silver(I) coordination polymers self-assembled through methanolysis of pyrazinecarbonitrile: Structure and photoluminescence. *Inorg. Chem. Commun.* **2009**, *12*, 1220–1223.
19. GUTMANN, B.; RODUIT, J.-P.; ROBERGE, D.; KAPPE, C. O. Synthesis of 5-substituted 1*H*-tetrazoles from nitriles and hydrazoic acid by using a safe and scalable high-temperature microreactor approach. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 7101–7105.
20. SONDHI, S. M.; RANI, R.; ROY, P.; AGRAWAL, S. K.; SAXENA, A.K. Conventional and microwave assisted synthesis of small molecules based biologically active heterocyclic amidine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 902–908.
21. SEINER, D. R.; HEDGE, S. S.; BLANCHARD, J. S. Kinetics and inhibition of nicotinamidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **2010**, *49*, 9613–9616.
22. OPLETALOVÁ, V.; PATEL, A.; BOULTON, M.; DUNDROVÁ, A.; LACINOVÁ, E., PREVOROVÁ, M.; APPELTAUEROVÁ, M.; COUFALOVÁ, M. 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093–1101.
23. KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M.; OPLETALOVÁ, V.; JAMPÍLEK, J.; DOLEŽEL, J.; DOHNAL, J.; POUR, M.; KUNEŠ, J.; VOŘÍŠEK, V. New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine ring derived from RP-HPLC study. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2008**, *73*, 1–18.
24. OPLETALOVÁ, V.; HARTL, J.; PATEL, A.; PALÁT, K., Jr.; BUCHTA, V.: Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco*. **2002,** *57*, 135–144.
25. CHLUPÁČOVÁ, M.; OPLETALOVÁ, V.; KUNEŠ, J.; KRÁĽOVÁ, K. Synthesis of 3-alkyl- and 3-arylsulfanyl-1,3-diphenylpropan-1-ones and their effects on two photosynthesizing organisms. *Folia Pharm. Univ. Carol*., **2004**, *31/32*, 109–115.
26. OPLETALOVÁ, V.; POUR, M.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; SILVA, L.; KRÁĽOVÁ, K.; MELTROVÁ, D.; PETERKA, M.; POSLEDNÍKOVÁ, M. Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, *71*, 44–58.

27. CHLUPÁČOVÁ, M.; OPLETALOVÁ, V.; KUNEŠ, J.; SILVA, L.; BUCHTA, V.; DUŠKOVÁ, L.; KRÁĽOVÁ, K. Synthesis and biological evaluation of some ring-substituted (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, **2005**, *33*, 31–43.
28. OPLETALOVÁ, V.; KALINOWSKI, D. S.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; POUR, M.; JAMPÍLEK, J.; BUCHTA, V.; RICHARDSON, D. R. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: Cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chem. Res. Toxicol*. **2008**, *21*, 1878–1889.
29. JAMPÍLEK, J.; OPLETALOVÁ, V.; DOLEŽEL, J.; DOHNAL, J. Preparation and hydrophobic properties of 5-arylalkylidenerhodanines. In: *Proceedings of the 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-11), November 1–30, 2007.* Seijas, J. A., Tato, M. P. V., Eds., [CD-ROM ed.] Basel: MDPI, 2007.
30. DOLEŽEL, J.; HIRŠOVÁ, P.; OPLETALOVÁ, V.; DOHNAL, J.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; JAMPÍLEK, J. Rhodanineacetic acid derivatives as potential drugs: Preparation, hydrophobic properties and antifungal activity of (5-arylalkylidene-4-oxo-2-thioxo-1,3-thiazolidin-3-yl)acetic acids. *Molecules* [online] **2009**, *14*, 4197–4212. Dostupné z URL: http://www.mdpi.com/1420-3049/14/10/4197/pdf.
31. ŠVEHLOVÁ, J. *Oximy jako léčiva.* Diplomová práce, Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK, 2008.
32. ROBBA, M. Contribution a l´etude de quelques dérivés des diazines. *Ann. Chim. (Paris)* **1960**, *5*, 351–379.
33. ROBBA, M. Etude de l´activité antituberculeuse de quelques dérivés nouveaux des diazines. *Ann. Pharm Fr.* **1960**, *18*, 519–527.
34. GEZGINCI, M. H.; MARTIN, A. R.; FRANZBLAU, S. G. Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids. 2. *J. Med. Chem*. **2001**, *44*, 1560–1563.
35. FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. et al. Recent developments in the Chemistry and in the biological Applicationss of amidoximes. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 1001–1047.
36. UCHIDA, M.; OKAZAKI, K.; MUKAIYAMA H. et al. Orally active factor Xa inhibitors: Investigation of a novel series of 3-amidinophenylsulfonamide derivatives using an amidoxime prodrug strategy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4682–4687.
37. GUSTAFSSON, D.; ELG, M. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran and its active metabolite melagatran: a mini-review. *Thromb. Res.* **2003**, *109(Suppl.)*, S9–S15.
38. BULTAS, J.; KARETOVÁ, D. Co nového můžeme očekávat v léčbě kardiovaskulárních chorob? *NEUMM – Odborný časopis o evropské medicíně* [online] **2008**, *3(1)* [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://www.neumm.cz/cz/archiv/347/casopis-neumm-1-2008.
39. BULTAS, J.; KARETOVÁ, D. Rivaroxaban – nové antitrombotikum na trhu. *Remedia* [online] **2009**, 241–244.

Dostupné z URL: http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Rivaroxaban-nove-antitrombotikum-na-trhu/6-E-GF.magarticle.aspx

40. WONG, P. C.; CRAIN, E. J.; WATSON, C. A. ET AL. Favorable therapeutic index of the direct factor Xa inhibitors, apixaban and rivaroxaban, compared with thrombin inhibitor dabigatran in rabbits. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 1313–1320.
41. PICCINI, J. P.; LOPES, R. D.; MAHAFFEY, K. W. Oral factor Xa inhibitors for the prevention of stroke in atrial fibrillation. *Curr. Opin. Cardiol.* **2010**, *25*, 312–320.
42. KOSHIO, H.; HIRAYAMA. F.; ISHIHARA, T. et al. Orally active factor Xa inhibitor: Synthesis and biologically aktivity of masked amidines as prodrugs of novel 1,4-diazepane derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5415–5426.
43. CLEMENT, B. Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metabolism Reviews* **2002**, *34*, 565–579.
44. HEBERLING, S.; GIRRESER, U.; WOLF, S. et al. Oxygen-insensitive enzymatic reduction of oximes to imines. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 354–365.
45. CLEMENT, B.; LOPIAN, K. Characterization of in vitro biotransformation of new, orally active direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 645–651.
46. SAULTER, J. Y.; KURIAN, J. R.; TREPANIER, L. A. et al. Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b_5 and NADH cytochrome b_5 reductase. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 1886–1893.
47. GRUENEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F. et al. The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8173–8177.
48. WAHL, B.; REICHMANN, D.; NIKS, D. et al. Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37847–37859.
49. CROWTHER, M. A.; WEITZ, J. I. Ximelagatran: the first oral direct thrombin inhibitor. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **2004**, *13*, 403–413.
50. BOUDES, P. L. The challenges of new drugs benefits and risk analysis: lessons from the ximelagatran FDA cardiovascular advisory committee. *Contemp. Clin. Trials* **2006**, *27*, 432–440.
51. AINSCOW, E. K.; PILLING, J. E.; BROWN, N. M. et al. Investigations into the liver effects of ximelagatran using high content screening of primary human hepatocyte cultures. *Expert Opin. Drug Saf.* **2008**, *7*, 351–365.
52. ANDERSSON, U.; LINDBERG, J.; WANG, S. et al. A system biology approach to understanding elevated serum alanine transaminase levels in a clinical trial with ximelagatran. *Biomarkers* **2009**, *14*, 572–586.
53. KEISU, M.; ANDERSSON, T. B. Drug-induced liver injury in humans: the case of ximelagatran. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2010**, *196*, 407–418.

54. O´CONNELL, T. M.; WATKINS, P. B. The application of metabonomics to predict drug-induced liver injury. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *88*, 394–399.
55. LISS, G.; RATTAN, S.; LEWIS, J. H. Predicting and preventing acute drug-induced liver injury: what´s new in 2010? *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol*. **2010**, *6*, 1047–1061.
56. RUSSMANN, S.; JETTER, A.; KULAK-UBLICK, G. A. Pharmacogenetics of drug-induced liver injury. *Hepatology* **2010**, *52*, 748–761.
57. SANFORD, M.; PLOSKER, G. L. Dabigatran exetilate. *Drugs* **2008**, *68*, 1699–1709.
58. THIBAULT, G.; TARDIF, P.; LAPALME, G. Comparative specificity of platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin antagonists. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **2001**, *296*, 690–696.
59. HAGEMEYER, C. E.; PETER, K. Targeting the platelet integrin GPIIb/IIIa. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 4119–4133.
60. LIPPI, G.; MONTAGNANA, M.; DANESE, E. et al. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: an update on the mechanism of action and use of functional testing methods to assess antiplatelet efficacy. *Biomark Med*. **2011**, *5*, 63–70.
61. WELLER, T.; ALIG, L.; BERESINI, M. et al. Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139–3147.
62. KITAMURA, S.; FUKUSHI, H.; MIYAWAKI, T. et al. Orally active GPIIb/IIIa antagonists: synthesis and biological activities of masked amidines as prodrugs of 2-[(3*S*)-4-[(2*S*)-2-(4-amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl]acetic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 268–277.
63. DOOLEY, M.; GOA, K. L. Lamifiban. *Drugs* **1999**, 57, 215–221.
64. DOOLEY, M.; GOA, K. L. Sibrafiban. *Drugs* **1999**, 57, 225–230.
65. NEWBY, L. K. Long-term oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism with sibrafiban after acute coronary syndromes: Study design of the Sibrafiban versus aspirin to yield maximum protection from ischemic heart events post-acute coronary syndromes (SYMPHONY) trial. American heart journal **1999**, *138*, 210–218.
66. ANDRONIK-LION, V.; BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M. et al: Formation of nitric oxide by cytochrome P450-catalyzed oxidation of aromatic amidoximes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992,** *185*, 452–458.
67. CHALUPSKY, K.; LOBYSHEVA, I.; NEPVEU, F. et al. Relaxant effect of oxime derivatives in isolated rat aorta: role of nitric oxide (NO) formation in smooth muscle. *Biochem. Pharmacol.* **2004,** *67*, 1203–1214.
68. SCHRÖDER, A., KOTTHAUS, J.; SCHADE, D. et al. Arylazoamidoximes and related compounds as NO-modulators. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*. **2010**, *343*, 9–16.
69. MANSUY, D.; BOUCHER, J.-L. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, 1105–1121.
70. ORESMAA, L.; KOTIKOSKI, H.; HAUKKA, M. et al. Synthesis and ocular effects of imidazole nitrolic acids. *J. Med. Chem.* 2055, 48, 4231-4236.
71. ORESMAA, L.; KOTIKOSKI, H.; HAUKKA, M. et al. Synthesis, ocular effects, and nitric oxide donation of imidazole amidoximes. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1073–1079.

72. ORESMAA, L.; KOTIKOSKI, H.; HAUKKA, M. et al. Synthesis and ocular effects of imidazole nitrolic acids and amidoxime esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2144–2147.
73. RACZ, I.; TORY, K.; GALLYAS, F. Jr. et al. BGP-15 a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1099–1111.
74. SZABADOS, E.; LITERÁTI-NAGY, P.; FARKAS, B. et al. BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 937–945.
75. BIRO, A.; KATZIR, Z. Combination of an aminoglycoside antibiotic and a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor for the treatment of aminoglycoside antibiotic associated nephrotoxicity. WO 2008050339, May, 2, 2008 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2008050339A2&KC=A2&FT=D&date=20080502&DB=EPODOC&locale=en_EP
76. FARKAS, B.; MAGYARLAKI, M.; CSETE B. et al. Reduction of acute photodamage in skin by topical application of a novel PARP inhibitor. *Biochem. Pharmacol*. **2002**, *63*, 921–932.
77. LITERÁTI-NAGY, B.; PÉTERFAI, É.; KULCSÁR, E. et al. Beneficial effect of the insulin sensitizer (HSP inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders. *Brain Res. Bull*. **2010,** *83*, 340–344.
78. NAGY, G.; SZARKA, A.; LOTZ, G. et al. BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **2010**, *243*, 96–103.
79. LITERÁTI-NAGY, P.; SZILVÁSSY, Z.; TORY, K. et al. Dose reduction of cannabinoid CB1 receptor antagonist in the treatment of overweight or obesity. WO 2009074835, June, 18, 2009 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2009074835A1&KC=A1&FT=D&date=20090618&DB=EPODOC&locale=en_EP
80. LITERÁTI-NAGY, P.; ROTH, J.; SZILVÁSSY, Z. et al. Pharmaceutical composition with antipsychotic, antidepressant or antiepileptic activity for prevention of weight gain. WO 2008053257, May, 8, 2008 [cit. 2011-02-16]. Dostupné z URL: http://v3.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=2008053257A1&KC=A1&FT=D&date=20080508&DB=EPODOC&locale=en_EP
81. LITERÁTI-NAGY, B.; KULCSÁR, E.; LITERÁTI-NAGY, Z. et al. Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm. Metab. Res.* **2009**, *41*, 374–380.
82. CLEMENT, B.; BÜRENHEIDE, A.; RIECKERT, W.; SCHWARZ, J. Diacetyldiamidoximeester of Pentamidine, a Prodrug for Treatment of Protozoal Diseases: Synthesis, in vitro and in vivo Biotransformation. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1260–1267.
83. CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126

84. KOTTHAUS, J.; HUNGELING, H.; REEH, C. Synthesis and biological evaluation of L-valine-amidoximeesters as double prodrugs of amidines. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1907–1914.
85. ANSEDE, J. H.; ANBAZHAGAN, M.; BRUN, R. et al. *O*-Alkoxyamidine Prodrugs of Furamidine: In Vitro Transport and Microsomal Metabolism as Indicators of in Vivo Efficacy in a Mouse Model of *Trypanosoma brucei rhodesiense* Infection. *J. Med. Chem.* **2004,** *47*, 4335–4338.
86. BOYKIN, D. W. Antimicrobial Activity of the DNA Minor Groove Binders Furamidine and Analogs. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002,** *13*, 763–771.
87. BOUHLEL, A.; CURTI, C.; LAGET, M. et al. Synthesis and evaluation of original amidoximes as antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7310–7320.
88. ISMAIL, M. A.; ARAFA, R. K.; WENZLER, T. et al. Synthesis and antiprotozoal activity of novel bis-benzamidino imidazo[1,2-*a*]pyridines and 5,6,7,8-tetrahydro-imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 683–691.
89. CHACKAL-CATOEN, S.; MIAO, Y.; WILSON, W. D. Dicationic DNA-targeted antiprotozoal agents: naphtalene replacement of benzimidazole. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7434–7445.
90. WENZLER, T.; BOYKIN, D. W.; ISMAIL, M. A. et al. New treatment option for second-stage African sleeping sickness: in vitro and in vivo efficacy of aza analogs of DB289. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009,** *53*, 4185–4192.
91. WERBOVETZ, K. Diamidines as antitrypanosomal, antileshmanial and antimalarial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2006**, *7*, 147–157.
92. SOEIRO, M. N.; DE CASTRO, S. L.; DE SOUZA, E. M. et al. Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2008**, *1*, 151–161.
93. PAINE, M. F.; WANG, M. Z.; GENERAUX, C. N. et al. Diamidines for human African trypanosomiasis. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2010**, *11*, 876–883.
94. BARRETT. M. P.; BOYKIN, D. W.; BRUN, R. et al. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1155–1171.
95. VON ESCH, A. M.; SHERMAN, W. R. 5-Nitro-2-furylamidoxime. US 3097214, July, 9, 1963 [cit. 2011-04-27]. Dostupné z URL: http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=3097214A&KC=A&FT=D&date=19630709&DB=EPODOC&locale=en_EP
96. KING, W. F. Pesticidal tin amidoximes. WO 8601800, March, 27, 1986 [cit. 2011-04-27]. Dostupné z URL: http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=8601800A1&KC=A1&FT=D&date=19860327&DB=EPODOC&locale=en_EP
97. MÜLLER, R.; BAYER, H.; SAUTER, H. et al. Fungicide mixtures. WO 9740674, November, 6, 1997 [cit. 2011-04-27]. Dostupné z URL: http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=9740674A1&KC=A1&FT=D&date=19971106&DB=EPODOC&locale=en_EP
98. SUZUKI, H.; MASAMI, H. Preparation of imidazole amidoximes as agrochemical microbicides. JP 03264564, November, 25, 1991; *Chem. Abstr.* **1992**, *116*, 123–284.

99. *Pneumocystis* spp. In *Doctor Fungus* [online]. © 2000-2007 doctorfungus.org. [cit. 2011-04-27]. Dostupné z URL: http://www.doctorfungus.org/Thefungi/Pneumocystis.php.

100. RUSSIAN, D. A.; KOVACS, J. A. Pneumocystis carinii: a fungus resistant to antifungals therapies – mechanisms of action of antipneumocystis drugs. *Drug Resist. Updat.* **1998**, *1*, 16–20.

101. BÜRENHEIDE, A.; KUNZE, T.; CLEMENT, B. Inhibitory effects on cytochrome P450 enzymes of pentamidine and its amidoxime pro-drug. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. **2008**, *103*, 61–65.

102. HALL, J. E.; KERRIGAN, J. E.; RAMACHANDRAN, K. et al. Anti-*Pneumocystis* activities of aromatic diamidoxime prodrugs. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1998**, *42*, 666–674.

103. BOYKIN, D. W.; KUMAR, A.; HALL, J. E. et al. Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-*O*-alkylamidoximes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996,** *6*, 3017–3020.

104. WANG, S.; HALL, J. E.; TANIOUS, F. A. et al. Dicationic dibenzofuran derivatives as anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents: synthesis, DNA binding affinity, and anti-*P. carinii* activity in an immunosupressed rat model. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 215–224.

105. PATRICK, D. A.; HALL, J. E.; BENDER, B. C. et al. Synthesis and anti-Pneumocystis carinii pneumonia activity of novel dicationic dibenzothiophenes and orally active prodrugs. *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, *34*, 575–583.

106. GOBIS, K.; FOKS, H.; KEDZIA, A. et al. Studies on pyrazine derivatives. XLVII. Synthesis and antibacterial activity of novel pyrazine derivatives with amidoxime moiety. *Acta Pol. Pharm. – Drug. Res*. **2006**, *63*, 39–46.

107. GOBIS, K.; FOKS, H; KEDZIA, A. et al. Synthesis and antibacterial activity of novel pyridine and pyrazine derivatives obtained form amidoximes. *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 1271–1279.

108. KAYUKOVA, L. A.; ORAZBAEVA, M. A. Synthesis of β-(thiomorfolin-1-yl)propionitrile and β-(thiomorfolin-1-yl)propioamidoxime. Preparation of *O*-aroyl-β-(thiomorfolin-1-yl)-propioamidoximes as potential antituberculosis agents. *Izv. Nats. Akad. Nauk Resp. Kaz., Ser. Khim.* **2007,** *5*, 37–42.

109. KAYUKOVA, L. A.; ORAZBAEVA, M. A. Synthesis of *O*-aroyl-β-(4-phenyl-1-piperazinyl)propioamidoximes with potential antituberculosis activity. *Izv. Nats. Akad. Nauk Resp. Kaz., Ser. Khim.* **2007,** *5*, 46–50.

110. KAYUKOVA, L. A.; BISMILDA, V. L.; CHINGISOVA, L. T. The in vitro antituberculosis properties of new derivatives of β-(thiomorfolin-1-yl) and β-(4-phenyl-1-piperazinyl)propioamidoximes. *Izv. Nats. Akad. Nauk Resp. Kaz., Ser. Khim.* **2009,** *3*, 20–23.

111. KAYUKOVA, L. A.; ORAZBAEVA, M. A.; BISMILDA, V. L.; CHINGISOVA, L. T. Synthesis and antituberculosis activity of *O*-aroyl-β-(4-phenylpiperazin-1-yl)propioamidoximes. *Pharm. Chem. J.* **2010**, *44*, 356–359.

112. PANCECHOWSKA-KSEPKO, D.; SPALIŃSKA, K.; FOKS, H. et al. Synthesis and antibacterial activity of new 1,4-disubstituted piperazine derivates. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem* **2008**, *183*, 1252–1263.

113. FONVIELLE, M.; WEBER, P.; DABKOWSKA, K.; THERISOD, M. New highly selective inhibitors of class II fructose-1,6-bisphosphate aldolases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2923 - 2926.
114. GANEM, B.; DONG, Y.; ZHENG, Y. F.; PRESTWICH, G. D. Amidrazone and Amidoxime Inhibitors of Squalene Hopene Cyclase. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5441-5446.
115. TIEMANN, F. Ueber die Einwirkung von Hydroxylamin auf Nitrile. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884,** *17***,** 126–129.
116. TIEMANN, F.; KRÜGER, P. Ueber Amidoxime und Azoxime. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884,** *17***,** 1685–1698.
117. ELOY, F.; LENAERS, R. The chemistry of amidoximes and related compounds. *Chem. Rev.* **1962**, *62*, 155–183.
118. ABELE, E.; ABELE, R.; LUKEVICS, E. Oimes of six-membered heterocyclic compounds with two or three heteroatoms: I. synthesis and structure (review). *Chem. Heterocycl. Compd.* **2009**, *45*, 1420–1140.
119. KATRITZKY, A. R.; KHASHAB, N. M.; KIRICHENKO, N.; SINGH, A. Microwave-assisted preparations of amidrazones and amidoximes. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9051–9056.
120. CHENG, Q.; LIU, G. Recent development in synthesis and application of amidoxime compounds. *Huagong Jinzhan* **2010**, *29*, 2373–2378; *Chem. Abstr.* **2011**, *154*, 463618.
121. National Committee for Clinical Laboratory Standards *ReferenceMethod for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard*, 2nd ed., NCCLS Document M27-2A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2002.
122. JONES, R. N.; BARRY, A. L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 1920–1925.
123. ZHANG, N.; AYRAL-KALOUSTIAN, S.; NGUYEN, T. et al. Synthesis and SAR of 6-chloro-4-fluoroalkylamino-2-heteroaryl-5-(substituted)phenylpyrimidines as anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 111–118.
124. GARIGIPATI, R. S. An efficient conversion of nitriles to amidines. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 1969–1972.
125. GIELEN, H.; ALONSO-ALIJA, C.; HENDRIX, M. et al. A novel approach to amidines from esters. *Tetrahedron Lett***. 2002**, *43*, 419–421.