

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
***FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ***  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV**



**Alkylaminoderiváty pyrazinamidu jako  
potenciální antituberkulotika**

Rigorózní práce

Vedoucí katedry:

Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Vedoucí rigorózní práce:

Mgr. Jan Zitko, Ph.D.

Řešitel:

Mgr. Michal Mlčoch

Hradec Králové, březen 2013

Za skvělé vedení, vstřícnost a cenné rady při vypracování této rigorózní práce bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Janu Zitkovi, Ph.D. Rovněž děkuji prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za jeho neustálý optimismus, příjemné jednání a ochotu pomoci. V neposlední řadě bych za neskonalou trpělivost také rád poděkoval MUDr. Terezii Bačovské a Ing. Tomáši Mlčochovi.

Michal Mlčoch

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

.....  
Mgr. Michal Mlčoch  
V Hradci Králové, 30. 3. 2013

Rigorózní práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (grantu GAUK B-CH/710312) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (SVV 267 001).

Tato publikace je výsledkem implementace projektu: „Podpora vytváření, rozvoje a mobility kvalitních výzkumně-vývojových týmů na Univerzitě Karlově“, registrační číslo CZ.1.07/2.3.00/30.0022, podporovaným operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost (OP VK) a financovaným z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.



## OBSAH

<b>I.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>II.</b>	<b>CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>III.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
1.	<i>TUBERKULÓZA.....</i>	<i>11</i>
1.1.	Obecný přehled.....	11
1.2.	Diagnostika.....	11
1.3.	Epidemiologie v ČR a v Evropě .....	12
1.4.	Epidemiologie celosvětově .....	15
1.5.	Cíle WHO .....	16
2.	<i>ANTITUBERKULOTIKA.....</i>	<i>17</i>
2.1.	Terapie obecně .....	17
2.2.	Pyrazinamid.....	18
2.3.	Potenciální léčiva .....	20
2.4.	Transportní systémy antituberkulotik.....	31
3.	<i>CHEMICKÉ OBMĚNY PYRAZINU A JEMU PODOBNÝCH JADER .....</i>	<i>35</i>
3.1.	Příprava derivátů karboxylových kyselin.....	35
3.2.	Substituce hydroxylové skupiny za atom chloru na pyrazinu a jemu podobných jádrech	36
3.3.	Substituce atomu chloru za aminovou (alkylaminovou) skupinu na pyrazinu a jemu podobných jádrech.....	37
<b>IV.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
4.	<i>PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, POUŽITÉ ANALYTICKÉ METODY.....</i>	<i>38</i>
5.	<i>POSTUP BIOLOGICKÝCH HODNOCENÍ.....</i>	<i>40</i>
5.1.	Testování antimykobakteriální aktivity .....	40
5.2.	Testování antifungální aktivity .....	40
5.3.	Testování antibakteriální aktivity.....	41
6.	<i>POSTUP PŘÍPRAVY 5-ALKYLAMINO- DERIVÁTŮ SUBSTITUOVANÉHO PYRAZIN-2-KARBOXAMIDU .</i>	<i>42</i>
7.	<i>VÝCHOZÍ LÁTKY.....</i>	<i>44</i>
8.	<i>NOVĚ PŘIPRAVENÉ LÁTKY .....</i>	<i>46</i>
9.	<i>VÝSLEDKY BIOLOGICKÝCH HODNOCENÍ .....</i>	<i>59</i>
9.1.	Antimykobakteriální aktivita.....	59
9.2.	Antifungální aktivita .....	60
9.3.	Antibakteriální aktivita .....	61

<b>V.</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>62</b>
10.1.	Syntéza .....	62
10.2.	Analýza .....	62
10.3.	Lipofilita látek.....	63
10.4.	Hodnocení biologické aktivity .....	65
<b>VI.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>70</b>
<b>IX.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>71</b>

## I. Seznam použitých zkratek

antiTBC – antituberkulotikum

AMB – amfotericin B

ATB – antibiotikum

ATP – adenosintrifosfát

BCG – Calmette-Guérin bacil

CAP – kapreomycin

CIP – ciprofloxacín

CCM (Czech Collection of Microorganisms) – Česká sbírka mikroorganismů

CFU (Colony Forming Unit) – jednotka formující kolonie

CNCTC (Czech National Collection of Type Cultures) – Česká národní sbírka typových kultur

DCC – *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA (deoxyribonucleic acid) – deoxyribonukleová kyselina

DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course) – režim plně kontrolované léčebné péče

EBA (Early Bactericidal Activity) – brzká baktericidní aktivita

EEA (European Economic Area) – evropský hospodářský prostor

EMB – ethambutol

ER –  $\beta$ -enoyl reduktasa

FaF – Farmaceutická fakulta

FAS I (Fatty Acid Synthase I) – enzym syntetizující mastné kyseliny

FDA (Food and Drug Administration, USA) – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FLU – flukonazol

FNHK – Fakultní nemocnice Hradec Králové

GAT – gatifloxacín

GP – glukanová částice

HBC (High-Burden Countries) – země s vysokým zatížením

HIV (Human Immunodeficiency Virus) – virus lidské imunitní nedostatečnosti

INH – isoniazid

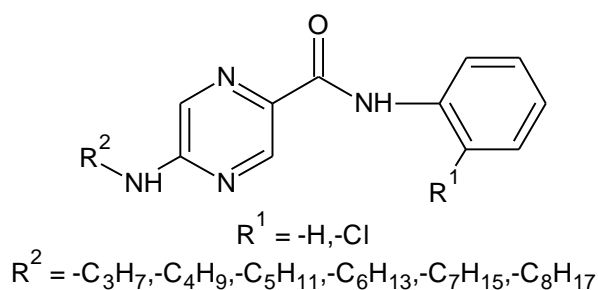
IR – infračervená spektroskopie  
KAOCH – Katedra anorganické a organické chemie  
KBLV – Katedra biologických a lékařských věd  
KFCHKL – Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv  
KR –  $\beta$ -ketoacyl reduktasa  
LPP (Large Porous Particle) – objemná porézní částice  
MDGs (Millenium Development Goals) – rozvojové cíle tisíciletí  
MDR (multidrug resistance) – mnohočetná léková rezistence  
MIC – minimální inhibiční koncentrace  
MK – mastná kyselina  
MOX – moxifloxacin  
MRSA – meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*  
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)  
NIAID – národní institut alergií a infekčních nemocí (Severní Korea)  
NIH (National Institutes of Health) – národní společenství pro zdraví (USA)  
PCR (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová reakce  
PEG – polyethylenglykol  
PEN – penicilin G  
PHE – fenoxymethylpenicilin  
PLA (polylactic acid) – kyselina polymléčná  
PLGA (polylactic-co-glycolic acid) – kopolymer kyseliny glykolové a mléčné  
POA – pyrazinkarboxylová kyselina  
PZA – pyrazinamid  
PZAasa – pyrazinamidasa  
RIF – rifampicin  
RNA (ribonucleic acid) – ribonukleová kyselina  
STR – streptomycin  
TBC – tuberkulóza  
TEA – triethylamin  
TLC (Thin Layer Chromatography) – tenkovrstvá chromatografie  
ÚZIS – Ústav zdravotnických informací a statistiky  
WHO (World Health Organization) – světová zdravotnická organizace  
XDR (extensive drug resistance) – extenzivní/extrémní léková rezistence



## II. Cíl rigorózní práce

Jedním z dílčích cílů Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv (KFCHKL) Farmaceutické fakulty (FaF) Univerzity Karlovy (UK) je syntéza potenciálních léčiv, zejména ze skupiny derivátů pyrazinu. Výzkum je zaměřen především na obměnu a syntézu účinného antituberkulotika (antiTBC) pyrazinamidu (PZA). Tento derivát nikotinamidu je základním léčivem pro terapii tuberkulózy (TBC). Molekula poskytuje zajímavý prostor pro obměnu její struktury, která by mohla v budoucnu přinést slibné výsledky při testech a studiích zaměřených na účinnost vůči mykobakteriálním kmenům.

Stejně jako v mojí diplomové práci jsem se zaměřil na přípravu série potenciálních antiTBC, derivátů PZA, u nichž by se dala očekávat biologická účinnost (antimykobakteriální či antifungální). Na KFCHKL byly již dříve připraveny antimykobakteriálně účinné anilidy 5-chlorpyrazinkarboxylových kyselin, proto jsem se v této práci zaměřil na obměnu těchto potenciálních antiTBC. Zmíněné látky byly na atomu chloru substituovány alkylaminovými řetězci (tato substituce se při předchozích biologických testováních ukázala být efektivní) se záměrem zvýšit jejich biologickou účinnost [1][2]. Cílem bylo připravit sérii alkylaminoderivátů pyrazinamidu (Obr. 1).



Obr. 1

U připravených látek byla pomocí fyzikálně-chemických metod ověřena jejich struktura. Mým úkolem bylo také zjistit a vypočítat hodnoty vybraných fyzikálně-chemických vlastností ( $\log k$ ,  $\log P$ ,  $\text{Clog } P$ ). U předchozích sérií hrála hodnota lipofility významnou úlohu pro antimykobakteriální účinek, proto byla snaha změřit tento parametr experimentálně.

Potencionální antimykobakteriální léčiva byla též odeslána k biologickému testování. Podle získaných dat bylo třeba zhodnotit aktivitu těchto látek. Následovala snaha nalézt vztahy mezi jejich strukturou a biologickým účinkem.

Dalším z mých cílů bylo vypracovat rešerši, která by měla již jen stručně shrnout důležité informace o TBC a současné terapii této nemoci. Dále jsem měl aktualizovat přehled o vývoji potenciálních antiTBC, představit některé nové systémy pro transport antiTBC a uvést některé základní informace o reaktivitě funkčních skupin na molekule pyrazinu, důležitých pro přípravu cílových struktur.

### III. Teoretická část

#### 1. Tuberkulóza

##### 1.1. Obecný přehled

Tuberkulóza (TBC) je závažné infekční onemocnění způsobené napadením hostitelského organismu bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis complex*. *M. tuberculosis* je obligátně aerobní, acidorezistentní tyč, nazývaná též dle svého objevitele jako Kochův bacil (objeven r. 1882). Nemoc se přenáší čtyřmi způsoby: vdechnutím (kapénková infekce), přijímáním infikované potravy, přímým kontaktem (např. přes poraněnou kůži), přímým vstupem do krevního oběhu (z matky na plod, nitrožilní injekcí) [3][4][5].

Infekce může postihnout kterýkoliv orgán, nejčastěji se jedná o plíce. TBC lze tedy rozdělit na formu plicní a mimoplicní. Plicní forma jednoznačně převládá, jedná se asi o 85 % případů. Zbýlých 15 % připadá na mimoplicní formu. Obě formy TBC mají na lidský organismus velmi závažný dopad. Pokud není infekce léčena, způsobuje smrt ve více než 50 % případů [3][4].

##### 1.2. Diagnostika

TBC je diagnostikována na základě anamnestických údajů, klinického stavu, rentgenového nálezu a především pomocí bakteriologického, popřípadě histologického vyšetření. Bakteriologické vyšetření na *M. tuberculosis* pak představuje zlatý standard diagnostiky TBC. Jedná se o nejspolehlivější diagnostickou metodu. Rentgenové vyšetření plic může být totiž v řadě případů nečitelné, či neposkytuje obvyklý a charakteristický obraz. Kromě plic může být navíc napaden kterýkoli jiný orgán, proto je důležité dodržovat základní diagnostické postupy [6].

Významným pokrokem v diagnostice pak bylo zavedení testu Xpert® MTB/RIF, jenž dokáže nejenom spolehlivě diagnostikovat TBC, ale také rozpoznat, zda je testovaný mykobakteriální kmen rezistentní na rifampicin [7].

##### *Xpert® MTB/RIF*

Jedná se o plně automatizovaný molekulární test pro zjištění diagnózy TBC a testování rezistence *M. tuberculosis* kmenů vůči rifampicinu (RIF). Ze vzorku sputa lze odečíst výsledky již za 2 hodiny od jeho odebrání. Test je zaměřen na příslušnou

sekvenci genomu *M. tuberculosis*. DNA sekvence (specifické pro *M. tuberculosis*) ze vzorku se vyčistí, zkoncentrují a amplifikují (pomocí PCR techniky). Test Xpert® MTB/RIF je také při rozboru cíleně orientován na mykobakteriální gen *rpoB*, jehož mutace způsobuje vznik rezistence na základní antiTBC RIF. Manipulace se vzorkem je velmi omezena a trvá přibližně 2 minuty, i tento fakt přispívá k jednoduchosti, bezpečnosti a efektivitě diagnostické metody. Test je velmi rychlý a poskytuje tak možnost okamžitého zásahu při odhalení infekce. Tento fakt vede k zrychlení a zefektivnění léčby (je možné nasadit účinnou kombinaci antiTBC). Test je zejména vhodný k použití v zemích s endemickým výskytem TBC [8][9].

Testovací set byl vyvinut společností Cepheid. Vývoj byl zahájen v roce 2006, přičemž v roce 2009 bylo zařízení připraveno k absolvování prvních studií. Ty byly úspěšné a tak byl přístroj v roce 2010 konečně schválen a podpořen WHO [10].

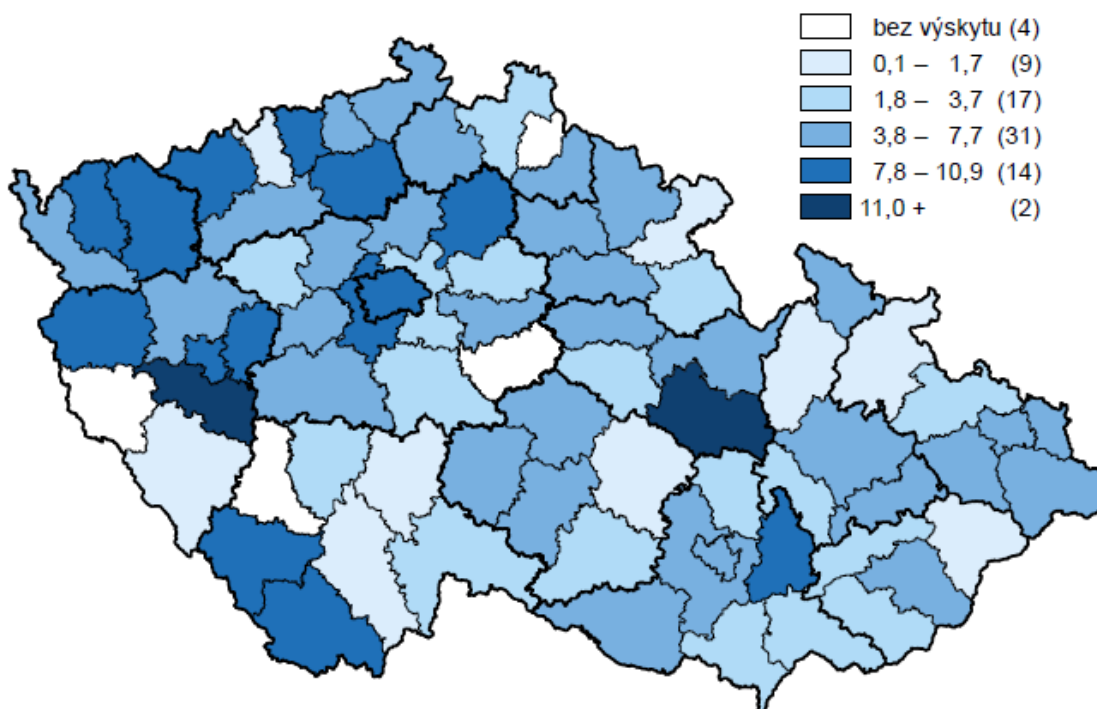
Tento test je doporučován WHO jako základní nástroj pro diagnózu TBC a zjišťování vzniku rezistence *M. tuberculosis* na RIF. Díky spolupráci s organizací UNITAID, zabývající se pozorováním, kontrolou a dotováním projektů souvisejících se zdravotnickými problémy, se podařilo zajistit dostatečné množství těchto přístrojů (cca 200) společně s testovacími nosiči (cca 1,4 milionu). Tento diagnostický materiál bude v letech 2013-2015 poskytnut vybraným zemím s vysokým výskytem TBC. Jedná se zejména o země západní Afriky a jižní Asie. Projekt bude podporován organizacemi UNITAID, Stop TB Partnership a WHO (Stop TB Department) [11][12].

### ***1.3. Epidemiologie v ČR a v Evropě***

Dle údajů získaných od Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) patří ČR k zemím s nízkým výskytem TBC, jak v Evropě, tak celosvětově. V roce 2010 se jednalo o výskyt 6,5 případů na 100000 obyvatel (obr. 2). V roce 2011 bylo do centrálního registru tuberkulózy v ČR hlášeno 609 případů TBC (všech forem a lokalizací). Oproti předešlému roku také klesla její incidence (5,8/100000). Tyto klesající hodnoty a hlavně nežádoucí účinky BCG vakcinace přispěly k rozhodnutí vlády k 1. 11. 2010 zrušit povinné plošné očkování proti TBC (BCG vakcína) [13][14].

Dále ÚZIS ještě uvádí: 91,5 % TBC připadá na plicní formu, 8,5 % je jiné lokalizace; poměr mužů a žen postižených TBC činí 3:1; rozložení onemocnění dle věku činí: do 15 let (1 %), 15 – 65 let (71 %), nad 65 let (28 %); dle mortality: 28 úmrtí na TBC (0,3/100000).

**Počet hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel**  
*Notified cases of TB per 100 000 inhabitants*



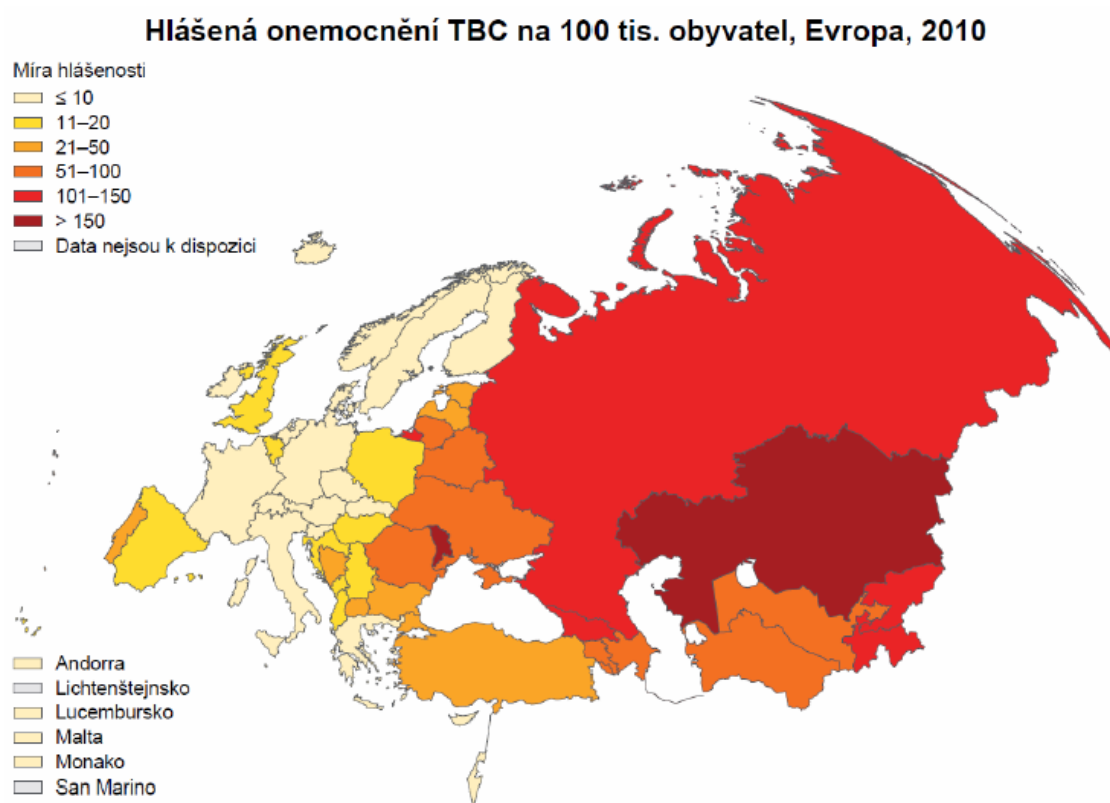
**Okresy České republiky**  
*Districts of the Czech Republic*



**Obr. 2:** Počet hlášených onemocnění TBC na 100000 obyvatel v ČR v roce 2011. Převzato dle: ÚZIS ČR; Tuberkulóza a respirační nemoci 2011 [14].

Jak již bylo zmíněno, ČR patří z hlediska výskytu TBC mezi země s příznivou situací. Příčinou jsou moderní metody léčby, kontrola situace TBC a povinné hlášení této nemoci do centrálního registru. I přes veškerou snahu zdravotnického systému úplně eliminovat toto onemocnění je eradikace TBC ještě vzdáleným cílem [14]. TBC je v České republice dle vyhlášky o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce z roku 2008 povinnému hlášení [15].

V rámci Evropské unie a Evropského hospodářského prostoru (EEA) byl vyšší výskyt TBC zaznamenán ve 21 státech, nižší v 5 státech a přibližně stejný ve 2 evropských zemích. Nejhuře v tomto ohledu dopadlo Rumunsko s 98,2 případy na 100000 obyvatel. Ve všech zemích Evropského regionu WHO bylo v roce 2010 evidováno přibližně 389 tisíc případů tohoto onemocnění, jedná se o 43,2 případů na 100000 obyvatel (Obr. 3), což představuje 4,7 % všech případů hlášených WHO [16].



**Obr. 3: Hlášená onemocnění TBC na 100000 obyvatel, Evropa 2010.** Převzato dle: ÚZIS ČR; *Aktuální informace č. 55/2012*, Tuberkulóza v Evropě v roce 2010 na základě výsledků Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe [16].

## ***1.4. Epidemiologie celosvětově***

### **Incidence**

Počet případů TBC byl v roce 2011 celosvětově odhadován na 8,7 milionu. Znamená to tedy poměr 125 případů na 100000 obyvatel. Pokud výsledky celkové incidence rozdělíme poměrově dle WHO regionů, dostaneme se k následujícím datům: nejvíce případů bylo zaznamenáno v Asii (59 %) a Africe (26 %). Daleko menší podíl patří regionu východního Středomoří (7,7 %), evropský a americký region se na celkové incidenci podílí nejméně a to 4,3 respektive 3 %. Na HBC (high-burden countries), tedy země s vysokým zatížením TBC jako jsou Indie, Čína, Indonésie atd., připadá 82 % všech případů. Dle incidence ve skupině HBC jsou nejvíce postiženy tyto státy: Indie 2-2,5 milionu, Čína 0,9-1,1 milionu, Jihoafrická republika 0,4-0,6 milionu, Indonésie 0,4-0,5 milionu a Pákistán 0,3-0,5 milionu případů. Součet všech případů z Indie a Číny dohromady činí 38 % celosvětové incidence [7].

Dle věku postižených připadá 0,5 milionu případů na děti, přibližně 2,9 milionu na ženy a zbytek tj. 5,3 milionu zastupují muži. Asi 1,1 milionu jedinců je infikovaných zároveň HIV (13 % z celkového množství). Zastoupení HIV pozitivních obyvatel je nejvyšší v Africe, tudíž největší podíl takto koinfikovaných obyvatel připadá logicky na státy tohoto regionu [7].

Míra incidence byla v letech 1990–2001 stabilní (přibližně 137/100000 obyvatel), pak začala pozvolně klesat. Při průzkumu mezi lety 2010-2011 incidence klesla o 2,2 %. Pokles incidence byl zaznamenán ve všech šesti regionech WHO, z toho nejvíce v evropském regionu, tj. 8,5 %. Dle posledních průzkumů klesá incidence také ve většině z 22 HBC [7].

### **Prevalence**

Pro rok 2011 byl počet odhadován na 12 milionů případů TBC. To je poměr 170 případů na 100000 obyvatel. Tento ukazatel zaznamenal od roku 1990 významný pokles a to o 36 %. Cíl organizace Stop TB Partnership, tedy snížení prevalence o polovinu k roku 2015 (dle STOP strategie), nebude globálně naplněn. Prevalence však nadále klesá ve všech regionech WHO. Americký region tento cíl splnil a to již v roce 2005. Naopak africký region a region východního Středomoří se nadále potýká s problémy a tento záměr bezpochyby nesplní [7].

## **Mortalita**

Odhadovaná hodnota úmrtnosti na TBC pro rok 2011 je přibližně 990000 případů (ze škály 0,84-1,1 milionu). Znamená to 14 případů úmrtí na 100000 obyvatel. Tato hodnota nezahrnuje počet případů HIV pozitivních zemřelých infikovaných také TBC (0,43 milionu). Kdybychom brali v úvahu i tyto případy, pak by mortalita byla asi 20/100000. Mortalita klesá ve všech regionech WHO. Její hodnota od roku 1990 klesla o 41 % (vyjma úmrtí spojených s HIV) [7].

### ***1.5. Cíle WHO***

Cílem WHO je zmírnění dopadů této nebezpečné infekční nemoci na obyvatelstvo celosvětově, zejména však v oblastech se zvýšeným výskytem TBC. Jinými slovy jde o naplnění programu *TB Stop Strategy*.

Mezi dílčí úkoly WHO pak patří:

- poskytování adekvátní a vysoce kvalitní zdravotní péče pro všechny
- snížení lidského strádání (sociálního, ekonomického) spojeného s TBC
- podpora vývoje nových prostředků pro léčbu a diagnostiku TBC a jejich včasné využití
- podpora a ochrana náchylných populací a jedinců vůči TBC a jejím rezistentním formám, jejich ochrana před koinfekcí TBC/HIV
- podpora práv obyvatelstva v otázce prevence, péče a kontroly

Dlouhodobým cílem je pak naplnění Rozvojových cílů tisíciletí (MDGs) v záležitosti tuberkulózy. Jedná se o cíl pro rok 2015, snížit prevalenci a mortalitu (spojenou s TBC) na 50 % ve srovnání s rokem 1990. Druhý cíl má být naplněn v roce 2050. Jde o ambiciózní záměr eliminovat TBC jako veřejný zdravotní problém. Celková incidence TBC aktivních případů by pak měla mít hodnotu méně jak 1 případ na 1000000 obyvatel za rok [7].



## 2. Antituberkulotika

### 2.1. Terapie obecně

Dle posledních trendů v terapii TBC je stále neúčinnější a WHO doporučovaný režim plně kontrolované léčebné péče (DOTS). Dle této strategie jsou pacienti s diagnostikovanou nemocí pozorně sledováni, vyšetřováni a léčeni po dobu nejméně prvních dvou měsíců od propuknutí onemocnění. Navzdory faktu, že jsou samotná antiTBC první linie účinná už v monoterapii, jsou pacienti v DOTS režimu léčeni nejprve kombinacemi těchto antiTBC. Takovýto přístup zvyšuje účinnost léčby a zároveň brání vzniku rezistence mykobakterií vůči účinným látkám [5][17].

Jako léčiva 1. linie se nadále používají streptomycin (STR), rifampicin (RIF), isoniazid (INH), ethambutol (EMB) a pyrazinamid (PZA). Všechna zmiňovaná antiTBC významně narušují metabolické procesy v mykobakteriální buňce, důležité pro její přežití [3][5].

Léčiva 2. linie jsou používána jako tzv. rezervní léčiva v situacích, kdy infekční agens nereaguje na terapii konvenčními antiTBC. Zmíněná rezistence mykobakteriálních kmenů vůči běžným léčivům pak vyžaduje provedení testů citlivosti na léčiva 2. linie, případně jejich nasazení. Jedná se o léčiva ethionamid, prothionamid, amikacin, kanamycin, kapreomycin, cykloserin, *para*-aminosalicylová kyselina a fluorochinolony [3][5].

Léčiva 1. a 2. linie a samotná léčba TBC byla již detailně popsána v mojí diplomové práci [5].

Protože je však tato práce zaměřená na syntézu potencionálních antiTBC odvozených od PZA, bude této molekule věnována zvláštní pozornost v kapitole 2.2. *Pyrazinamid*.

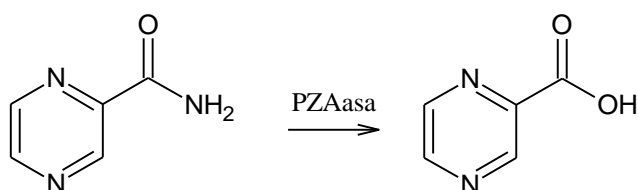
## 2.2. Pyrazinamid

Pyrazinamid nebo také pyrazin-2-karboxamid je jedním z antiTBC první linie. Jedná se o analog nikotinamidu a je jedinečnou a nezbytnou součástí programu DOTS v léčbě TBC. Díky této látce lze zkrátit celkovou dobu léčby TBC o 3 až 6 měsíců. Mechanismus účinku této látky dosud nebyl plně objasněn. Předpoklad, že aktivní molekulou je pyrazinkarboxylová kyselina (POA), vznikající z PZA, acidifikující prostředí mykobakteriální buňky a rozvracející membránový transport a funkci enzymu syntetizujícího mastné kyseliny (FAS I), byl rozšířen o poznatek, že PZA je pravděpodobně účinný již v nativní formě. PZA totiž inhibuje vazbu redukčního činidla NADPH, vážící se na FAS I mykobakteriální buňky. Porušení správné funkce tohoto enzymu syntetizujícího mastné kyseliny (MK), tolik nezbytné pro stavbu buněčných membrán a uchovávání energie, tak vede k fatálnímu rozvratu buňky [18][19][20].

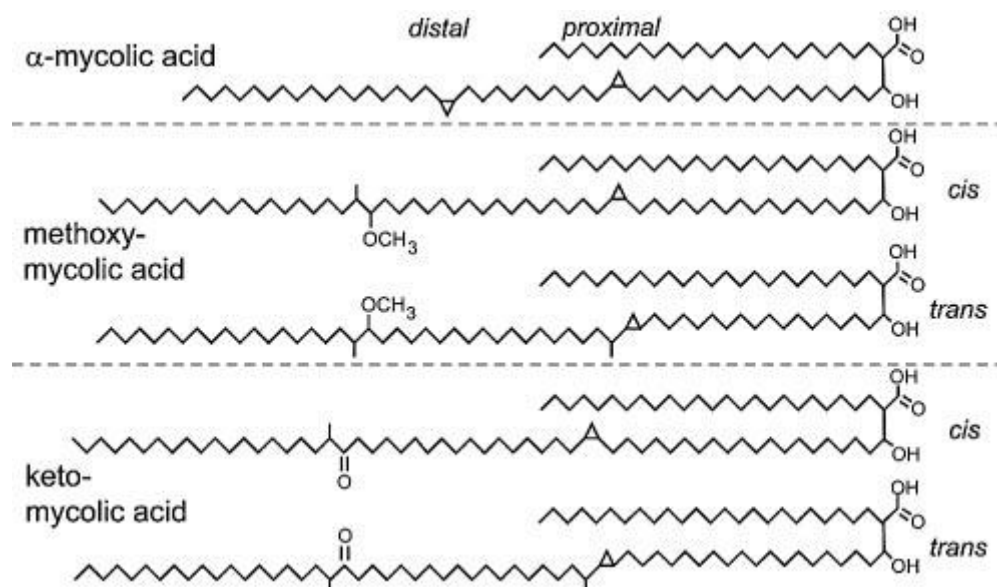
Samotná účinnost PZA jako proléčiva je velice závislá na pH okolního prostředí. Jak je výše zmíněno, jako hlavní metabolit této látky vzniká molekula POA, a to pomocí enzymu pyrazinamidasy (PZAasa) (Obr. 4). Tento enzym je kódován genem *pncA*. Mutace genu *pncA* vede k vzniku rezistence mykobakterie na PZA [21]. V kyselém prostředí je aktivita POA nejvyšší a to při pH 5,5. Se zvyšující se hodnotou tohoto exponentu aktivita výrazně klesá a nejnižší je při hodnotách pH 12-14 [21][22].

Samotný enzym FAS I je buněčný útvar bílkovinné povahy, zodpovědný za syntézu mastných kyselin (zejména mykolových). Protein se skládá ze 3 stejných řetězců (homomer). Každý řetězec obsahuje všech 6 katalytických domén, na kterých jsou, na sebe navazujícími enzymatickými procesy, MK syntetizovány [23][24][25].

V buňce *M. tuberculosis* jsou syntetizovány tři základní strukturální třídy mykolových kyselin (obr. 5). Jsou to  $\alpha$ -, metoxy- a keto-mykolové kyseliny, z nichž nejvíce zastoupená je právě  $\alpha$ -mykolová kyselina (70 %). Ostatní třídy jsou zastoupeny přibližně v 10-15 % [26].



**Obr. 4: Enzymatická přeměna PZA na POA.** Převzato dle: MLČOCH, M.; Deriváty pyrazinu jako potenciální antimykobakteriální léčiva II. *Diplomová práce*. 2012 [5].



**Obr. 5: Třídy mykolových kyselin – chemická struktura.** Převzato se souhlasem: TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, S. G.; Pathway to synthesis and processing of Mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* [17].

Podle posledních výzkumů je ale molekula PZA, stejně jako POA, schopna reverzibilně se vázat na FAS I mykobakteriální buňky a narušovat tak její lipidový metabolismus. PZA kompetitivně inhibuje vazbu NADPH k FAS I, přesněji vazbu na  $\beta$ -ketoacyl reduktasu (KR) a  $\beta$ -enoyl reduktasu (ER) tohoto komplexu [18].

POA se však na tento komplex váže v jiném místě než PZA. Tento poznatek přispěl k výzkumu antimykobakteriálně účinnějších látek, než je samotný PZA. Jedná se zejména o 5-halo- substituovanou POA a také estery této kyseliny. Významnější výsledky byly již publikovány s látkou 5-chlorpyrazinamid [19][20].

POA vzniklá enzymatickou přeměnou z PZA také inhibuje *trans*-translační proces v mykobakteriální buňce. Tímto procesem je zajišťována recyklace ribozomu a s ním i defektního proteinu, vzniknuvšího při narušené translaci (překlad mRNA do podoby řetězce aminokyselin). Důležitou roli v recyklačním procesu hraje tmRNA (transfer-messenger RNA), která je schopná defektní řetězec odstranit a znovu tak uvést ribozom do chodu. POA se váže na ribozomální protein RpsA, jenž je nezbytný pro vazbu mezi ribozomem a tmRNA. Tím je ribozom ireverzibilně zablokován a degradován [27].

Následkem obou procesů je nastolení stresových podmínek pro mykobakteria. Jsou to hypoxie, buněčné hladovění, nedostatek energie, překyselení buňky atd. Všechny tyto stresující faktory hrají velikou roli v potenciaci účinku PZA [27].

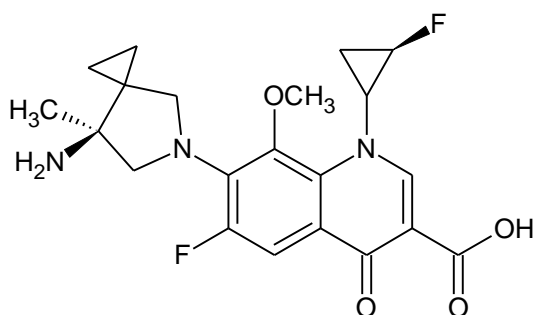
### 2.3. Potenciální léčiva

#### a) Látky v preklinických studiích

##### DC-159a

Tuto látku lze stejně jako gatifloxacin či moxifloxacin zařadit do skupiny fluorochinolonů, jež jsou klíčovou skupinou pro léčbu MDR-TBC. Tyto látky působí na mykobakterie mechanismem inhibice gyrasové aktivity v buněčném jádře. Inhibicí tohoto enzymu tak docílíme omezení replikace DNA patogenní buňky [28].

Molekula vykazuje dobrou aktivitu jak *in vivo*, tak *in vitro* i u chinolon-rezistentních mykobakteriálních kmenů. DC-159a má tedy velký potenciál pro využití k léčbě rezistentních kmenů TBC. Látka nyní prochází preklinickými studiemi [29][30][31].

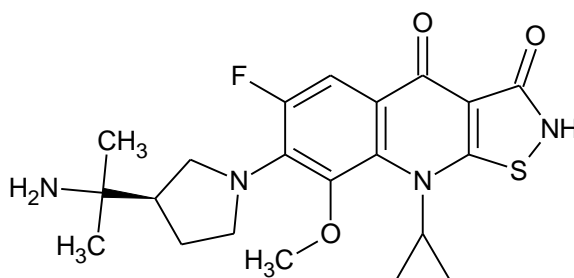


DC-159a

##### ACH-702

ACH-702 je derivátem chinolonu. V poloze 3 je typický chinolonový skelet substituován isothiazolonovým kruhem. Tato látka cíleně poškozuje bakteriální replikaci tím, že napadá jak enzym topoisomerasu IV, tak i DNA gyrasu [32].

Molekula byla již testována vůči mnoha druhům bakterií a ukázala se být velice efektivní. Slibné výsledky přinesla její aktivita vůči MRSA či vankomycin-rezistentním enterokokům. Ukázalo se, že minimální inhibiční koncentrace (MIC) proti klinickým izolátům *M. tuberculosis* má srovnatelnou aktivitu při použití MIC moxifloxacinu [33][34].

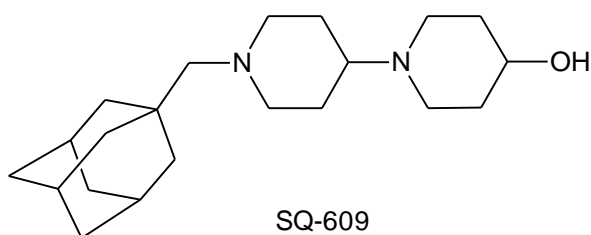


ACH-702

## SQ609

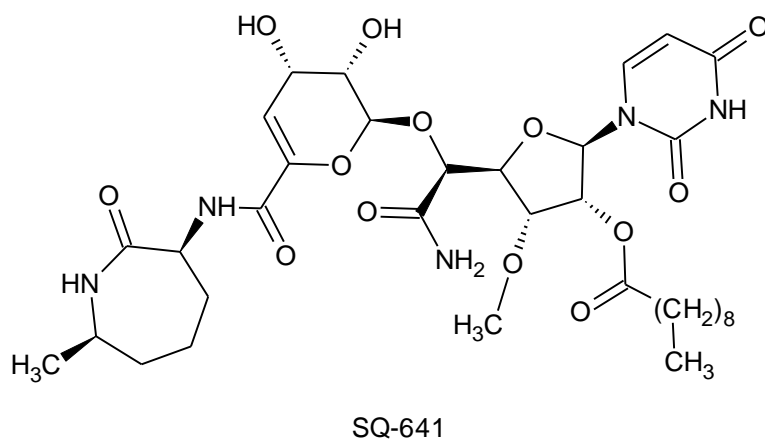
Molekula má dipiperidinový skelet, stejně jako předchozí dipiperidinová analoga (nejaktivnější SQ614, SQ615) [35], která již dříve vykazala významnou antimykobakteriální aktivitu. Jedná se o látku z rozsáhlé knihovny diaminů čítající přes 10000 molekul. Jde o inhibitor bakteriálního enzymu translokasy, který je důležitý pro stavbu buněčné stěny [29][36].

Látka SQ609 je při *in vitro* testech s infikovanými makrofágy schopna inhibovat až 90 % bakteriálního růstu. Přitom nevykazuje prakticky žádnou toxicitu. Látka je schopna prodloužit terapeutický efekt až na 2 týdny po skončení terapie [37].



## SQ641

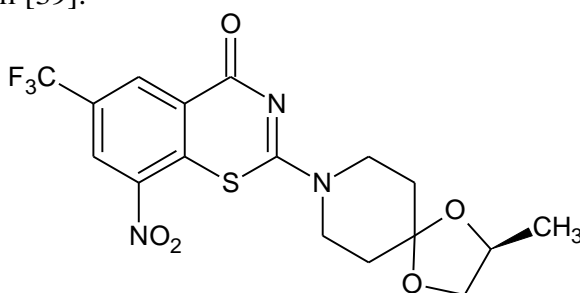
Molekula SQ641 je semisyntetické antibiotikum. Inhibuje bakteriální enzym translokasu 1 (TL-1), jenž je důležitý pro stavbu buněčné stěny bakterií (enzym je nezbytný pro biosyntézu peptidoglykanové vrstvy). Tento enzym se v eukaryotické buňce nevyskytuje. Je tedy zajímavým objektem pro výzkum a vývoj nových antibiotik podobné struktury, zacílených právě na enzym TL-1. Tato látka vykazuje synergii s antiTBC jako jsou ethambutol, streptomycin a SQ109. Slibný je také její dlouhotrvající účinek (až 55 hodin po podání antibiotika) [33].



### BTZ043

Molekulu lze zařadit mezi benzothiazinony, obsahuje heterocykl s atomem síry. Ve své struktuře obsahuje (kromě již zmíněného atomu síry) také jednu nitroskupinu. BTZ043 je díky své vysoké aktivitě proti mykobakteriím nyní podrobena preklinickému testování [29][38].

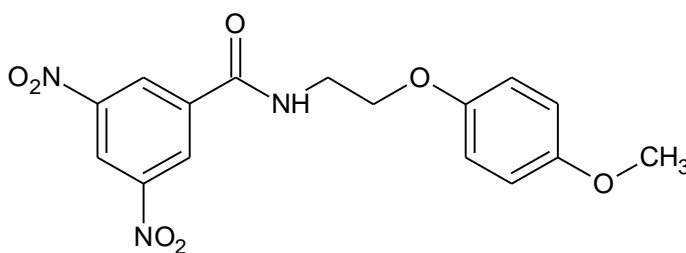
Inhibuje dekaprenyl-fosforyl- $\beta$ -D-ribose 2'-epimerasu. Jde o enzym umožňující epimerizaci dekaprenylfosforyl ribosy na dekaprenylfosforyl arabinosu, jenž je prekurzorem k syntéze polysacharidu arabinanu. Ten je nezbytný pro správnou stavbu buněčné stěny bakterií [39].



BTZ043

### DNB1

DNB1 je tvořen benzamidovým skeletem se dvěma navázanými nitroskupinami. Mechanismus jejího účinku je totožný jako u výše uvedené látky BTZ043. Tato molekula vykazala vysokou aktivitu vůči XDR *M. tuberculosis* kmenům [29][36].

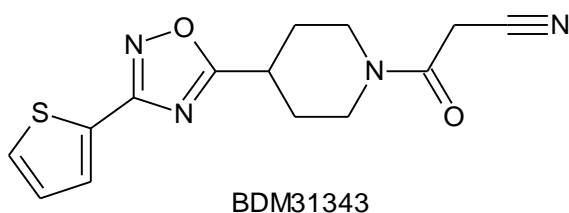


DNB1

### BDM31343

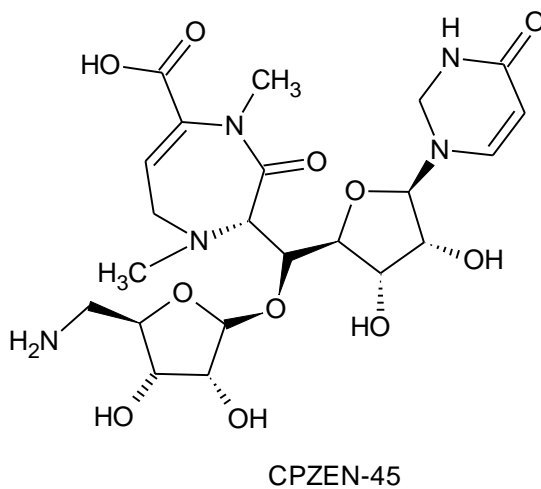
1,2,4-oxadiazol BDM31343 je látka syntetizovaná za účelem podpořit účinek antiTBC 2. linie – ethionamidu. Úkolem této látky je vytvořit příhodné podmínky pro jeho aktivaci. EMB je jako proléčivo zpracováván pomocí mykobakteriálního enzymu mono-oxygenasy zvané EthA. Expres tohoto enzymu je limitována působením

repressoru EthR, jež je právě cílem pro vazbu s BDM31343. Látka v současnosti prochází preklinickými studiemi [36][40].



### CPZEN-45

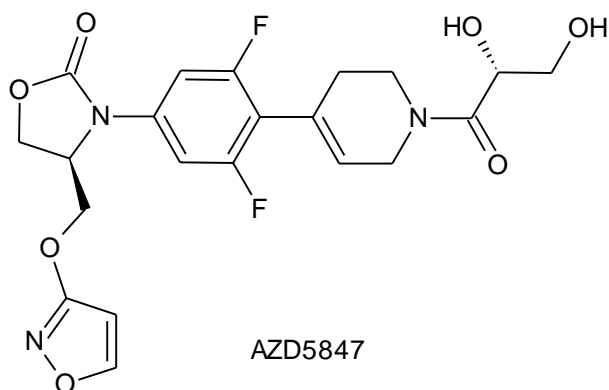
Jedná se o nukleosidové antibiotikum produkované *Streptomyces* spp. Tato molekula byla poprvé popsána v roce 2003 v Japonsku. Je aktivní jak proti replikujícím se mykobakteriím, tak proti mykobakteriím v dormantním stadiu *in vitro*. Předpokladem je, že stejně aktivní bude CPZEN-45 i *in vivo*. Mechanismus účinku této látky nebyl dosud plně objasněn [41].



## b) Látky v 1. fázi klinických studií

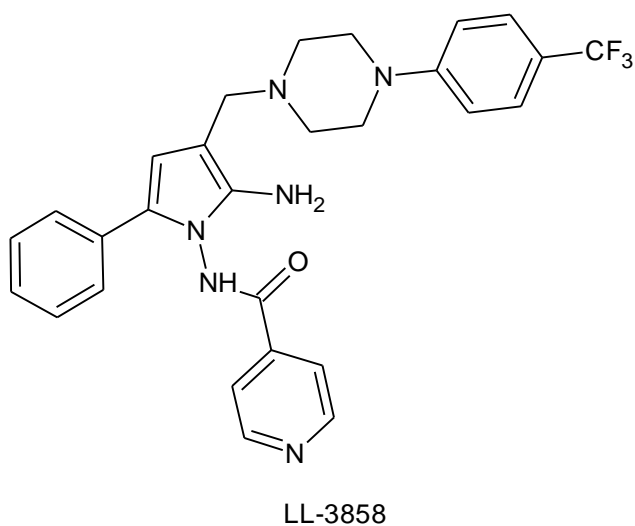
### AZD5847

Jedná se o molekulu vyvinutou společností AstraZeneca. Jde o derivát oxazolidinonu a molekula je také známa pod označením AZD2563. Nachází se v 1. fázi klinického zkoušení, kde neprokázala významnou toxicitu. Vstup do 2. fáze klinických testů by látka měla vstoupit v roce 2012 [29][42].



### LL-3858

Jde o pyrrol, obsahující ve své molekule isoniazidovou strukturu. LL-3858, známý též jako Sudoterb, je vhodný k podání do kombinace s antiTBC první linie [33][43].

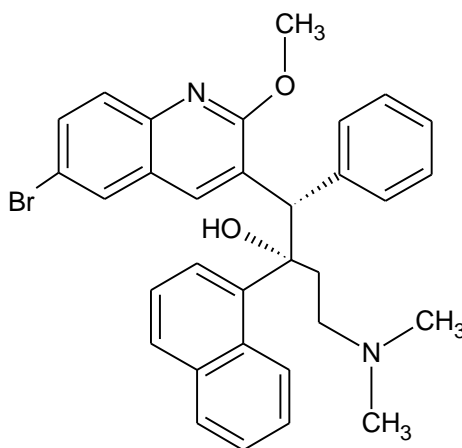




### c) Látky v 2. fázi klinických studií

#### TMC207 (Bedaquilin)\*

Jde o diarylchinolin, označovaný též jako R207910. Látka byla vyvinuta společností Johnson&Johnson. TMC207 narušuje mykobakteriální ATP-synthasu, neovlivňuje ale hostitelskou DNA gyrasu. Molekula je aktivní zejména vůči mykobakteriím v dormantním stadiu a je účinným nástrojem v boji proti MDR-TBC kmenům. Nežádoucí účinky této látky se objevují jen zřídka, většinou jde o nauseosní stavy [29][36][44].

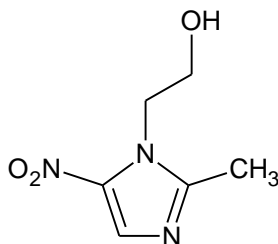


TMC207

#### Metronidazol

Tato molekula patří do skupiny nitroimidazolů. Molekula metronidazolu byla vyvinuta již v roce 1960. V moderní medicíně je užívána k léčbě protozoálních infekcí a infekcí způsobených anaerobními bakteriemi. Předpokladem bylo, že bude účinně působit také na mykobakterie [45].

Dle výsledků výzkumu Brooks [46] a kol. byla zjištěna pouze nízká aktivita metronidazolu vůči *M. tuberculosis* jak v monoterapii, tak v kombinaci s isoniazidem. V současné době se látkou zabývá severokorejský národní institut alergií a infekčních nemocí (NIAID). Zde probíhá výzkum a testování účinků metronidazolu, pokud je zařazen do standardní léčby antiTBC druhé linie [29].



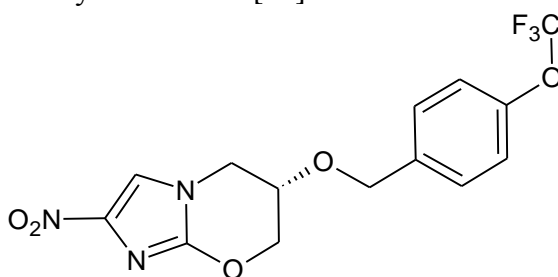
Metronidazol

## PA-824

Molekula bicyklické struktury byla v sedmdesátých letech 20. století testována v radioterapii při léčbě rakoviny se záměrem zvýšit radiosenzitivitu nádorových buněk. Prokázala ale také *in vitro* i *in vivo* antimykobakteriální účinky. Na počátku testování těchto bicyklických molekul stála látka CGI 17341, jež se prokázala být antimykobakteriálně aktivní. Vykázala ale i mutagenní účinky, proto byl výzkum této látky v souvislosti s TBC ukončen. Nicméně z testování série podobných bicyklických sloučenin vzešla jako slibné antiTBC látka s označením PA-824. Jde o proléčivo, které pro svou přeměnu na aktivní molekulu potřebuje mykobakteriální deazaflavin (F420)-dependentní nitroreduktasu, známou též jako Ddn (Rv3547) [29][33][36].

Mechanismus účinku této látky spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny mykobakterií. Stover [47] a kol. zjistili, že PA-824 inhibuje syntézu kyseliny mykolové, základní látky pro stavbu buněčné stěny mykobakterií. PA-824 je také rozkládána na reaktivní produkty, která jsou schopny inhibovat proteosyntézu, či vytvářet toxický oxid dusnatý. Látka je testována jak v monoterapii, tak v kombinacích s ostatními antiTBC [29][44][48].

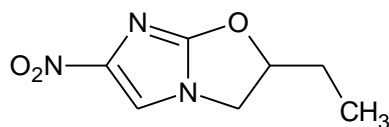
Podle posledních výzkumů by mohla tato látka v kombinaci s antiTBC první linie výrazně snižovat délku léčby MDR-TBC [49].



PA-824

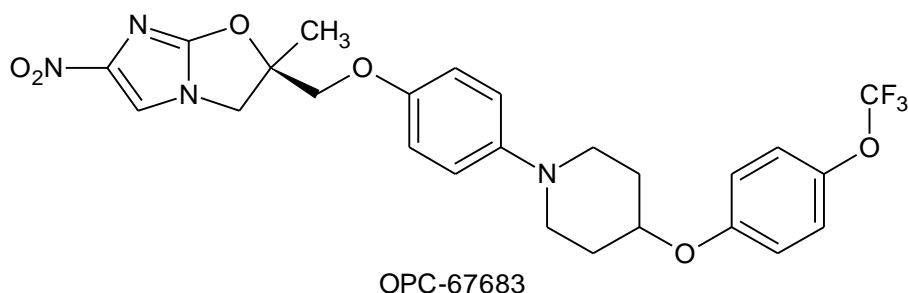
## OPC-67683 (Delamanid)

Tato molekula, jejíž předlohou je látka **CGI 17341**, byla vytvořena s cílem zvýšit antimykobakteriální aktivitu a zároveň snížit toxicitu uvedené předlokové molekuly. Jedná se o proléčivo a působí podobným mechanismem jako PA-824. Inhibuje syntézu mehoxy- a keto-mykolové kyseliny [7][44][50].



CGI 17341

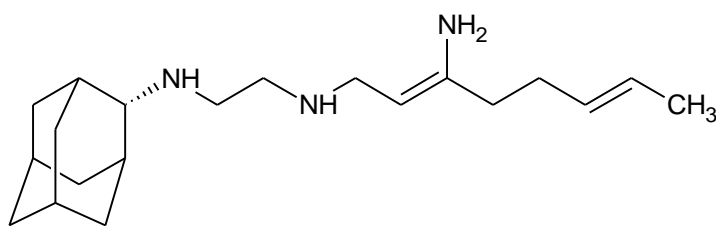
U této látky nebylo zaznamenáno antagonistující působení v kombinaci se základními antiTBC (STR, INH, EMB, RIF). Při zkoušených dávkách nebyla zaznamenána významná toxicita této látky [29][48].



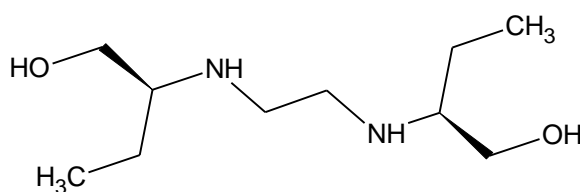
### SQ109

Jedná se o analog antiTBC 1. linie ethambutolu. Mechanismus účinku této látky není zcela známý. Jisté však je, že působí inhibičně na růst buněčné stěny - pravděpodobně snížením produkce  $\beta$ -ketoacyl-acyl proteinového nosiče. Předpokladem také je, že SQ109 způsobuje nadprodukcí ATP dependentního enzymu DNA/RNA helikasy, rozdělujícího dvoušroubovici DNA/RNA do dvou izolovaných vláken [51].

Výhodou této látky je její účinnost na EMB a RIF rezistentní kmeny mykobakterií. Schopnost SQ109 zabít mykobakterie v monoterapii je vysoká, s užitím v kombinaci s antiTBC isoniazidem a rifampicinem však roste. Studie, zabývající se klinickým užitím této látky, prokazují, že denní dávka 300 mg je pro pacienty bezpečná a netoxická. 1. fáze klinických studií této látky byla úspěšně ukončena v roce 2009. Látka se momentálně nachází v 2. fázi klinického testování [36][51][52].



SQ-109



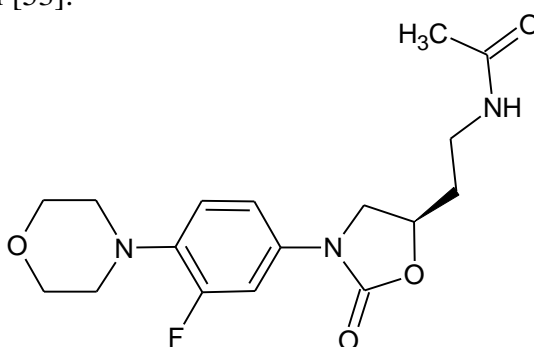
Ethambutol

## Linezolid

Jedná se o molekulu obsahující heterocykl oxazolidin. Tato látka byla původně uvedena k terapii infekcí (zejména kožních) způsobených gram-pozitivními bakteriemi. Léčba touto látkou obvykle trvá nejméně 4 týdny a déle [29].

Mechanismus účinku linezolidu spočívá v narušení proteosyntézy mykobakteriální buňky. Molekula se váže na 50S podjednotku bakteriálního ribozomu. Výhodou je, že nepůsobí zkříženou rezistenci s ostatními antibiotiky [53].

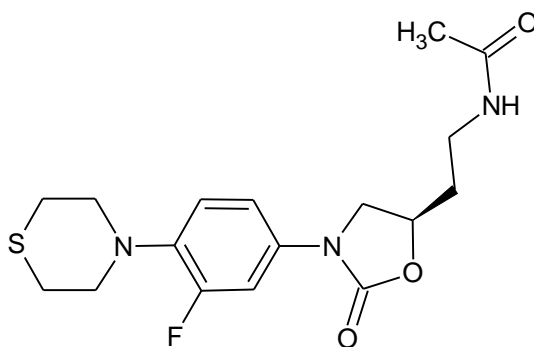
Bohužel se u této látky, zejména při dlouhodobém užívání, vyskytují nežádoucí účinky (neuropatie). Přesto se používá v terapii MDR-TBC a XDR-TBC jako léčivo 3. linie v použití off-label [53].



Linezolid

## PNU-100480 (Sutezolid)

Molekula PNU-100480 je thioanalogem výše uvedeného linezolidu. Byla vyvinuta společností Pfizer a byla syntetizována za účelem zvýšit terapeutický index tohoto typu látek. Baktericidní účinek tohoto potencionálního antiTBC je srovnatelný s účinkem isoniazidu. Při nasazení molekuly v kombinacích s konvenčními antiTBC (zejména s pyrazinamidem) navíc zvyšuje baktericidní vlastnosti a celkový účinek léčby. Při konvenčním dávkování nebyla u této látky zjištěna toxicita a je pokládána za bezpečnou [33][54].



PNU-100480

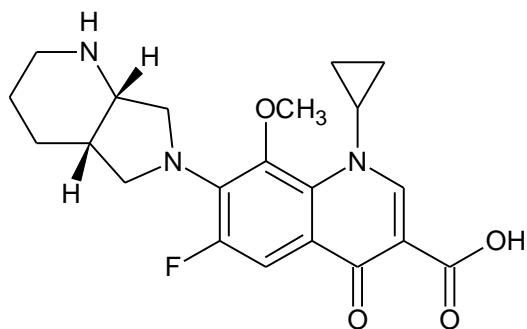
#### d) Látky v 3. fázi klinických studií

V této závěrečné části klinických studií se nacházejí dvě látky fluorochinolonového typu. Jedná se o **moxifloxacin** (MOX) a **gatifloxacin** (GAT). Tyto látky specificky účinkují na mykobakteriální DNA gyrasu. Vykazují *in vitro* vyšší aktivitu než látky starší generace fluorochinolonů (ciprofloxacin, ofloxacin) [55].

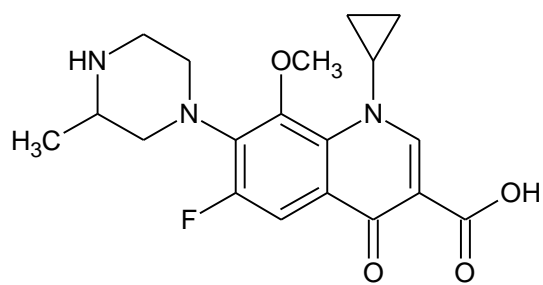
V klinických testech bylo zjištěno, že MOX a GAT prokázaly vysokou biologickou dostupnost a také velmi efektivní brzkou baktericidní aktivitu (EBA). EBA představuje pokles množství jednotek formujících kolonie (CFU) bakterií v 1 ml sputa za den během prvních dvou dnů léčby. Hodnota EBA u těchto látek je přibližně srovnatelná jako při použití antiTBC isoniazidu jako standardu. V praxi se používají pro léčbu MDR-TBC nebo pro léčbu pacientů, kteří nejsou schopni tolerovat antiTBC první linie [56].

Obě látky jsou bezpečné a dobře tolerované, což se prokázalo při jejich dlouhodobém podávání pacientům při jednorázových 400 mg denních dávkách. Mezi zjištěné nežádoucí účinky patří bolest hlavy a gastrointestinální potíže. Gatifloxacin by mohl také způsobovat poruchy regulace glykémie, a to jak u diabetiků, tak u pacientů s neprokázaným diabetem v anamnéze [33].

Obě molekuly již dosáhly 3. fáze klinických studií a především gatifloxacin slibuje zkrácení DOTS terapie TBC ze 6 na 4 měsíce. Standardní lék ethambutol je během tohoto testování zaměňován za gatifloxacin [29][33].



Moxifloxacin



Gatifloxacin

\*) Látka TMC207 (Bedaquilin) byla agenturou FDA dne 28. 12. 2012 schválena pro léčbu MDR-TBC [57].

**Tabulka 1: Přehled potencionálních antiTBC vedených v preklinických a klinických studiích.**  
 Tabulka vytvořena na základě informací z následující literatury [29][30][33][36][44][45][48][49][53][56].

Látka	Skupina	Mechanismus účinku	Druh studie	Fáze
ACH-702	Isothiazolochinolony	inhibice syntézy nukleových kyselin (DNA gyrasa)	nová látka	preklinická
SQ641	Kapuramyciny	inhibitor syntézy buněčné stěny (translokasa)	nová látka	preklinická
BTZ043	Nitrofenyly	inhibitor syntézy buněčné stěny	nová látka	preklinická
DNB1		inhibitor syntézy buněčné stěny	analog	preklinická
BDM31343	1,2,4-Oxadiazoly	inhibitor syntézy buněčné stěny	nová látka	preklinická
CPZEN-45	Kaprazeny	neznámý	nová látka	preklinická
AZD5847	1,3-Oxazolidinony	inhibice proteosyntézy *	analog	klinická I.
LL-3858	Pyrroly	inhibice proteosyntézy	nová látka	klinická I.
TMC207	Diarylchinoliny	inhibice ATP synthasy	nová látka	klinická II.
Metronidazol	Nitroimidazoly	pro TBC neznámý	nová indikace	klinická II.
PA-824		inhibitor syntézy buněčné stěny	analog	klinická II.
OPC-67683		inhibitor syntézy buněčné stěny	analog	klinická II.
SQ609	Diaminy	inhibitor syntézy buněčné stěny (translokasa)	analog	preklinická
SQ109		inhibitor syntézy buněčné stěny *	nová látka	klinická II.
Linezolid	1,3-Oxazolidinony	inhibice proteosyntézy	nová indikace	klinická II.
PNU-100480		inhibice proteosyntézy	analog	klinická II.
DC-159a	Fluorochinolony	inhibice syntézy nukleových kyselin (DNA gyrasa)	nová látka	preklinická
Moxifloxacin		inhibice proteosyntézy (DNA gyrasa)	nová indikace	klinická III.
Gatifloxacin		inhibice proteosyntézy (DNA gyrasa)	nová indikace	klinická III.

\*) jedná o pravděpodobný mechanismus účinku látek

## **2.4. Transportní systémy antituberkulotik**

Léčba TBC je časově poměrně náročný proces. Délka léčby u non-rezistentních TBC kmenů trvá obvykle 6-9 měsíců, rezistentní kmeny vyžadují léčbu antiTBC až 2 roky. Délka léčby TBC je jeden z největších faktorů, proč léčba selhává. K snížení pacientovy compliance přispívají také nežádoucí účinky léčiv. U MDR-TBC jsou použita antiTBC druhé linie, jejichž nežádoucí účinky jsou ve srovnání s léčivými první linie daleko vyšší. V neposlední řadě hraje svoji roli i vysoká cena antiTBC, léčba MDR-TBC je několikanásobně dražší [58].

Současný výzkum se proto zabývá úkolem, jak tyto nežádoucí účinky léčiv snížit na minimum. Velmi slibný je tudíž výzkum nových způsobů podání antiTBC, jedná se zejména o léčbu inhalací (85 % případů TBC je plicního typu). Velkou výhodou tohoto způsobu léčby je přímá interakce účinné látky s plicní tkání, snížení její degradace a nižší dávkování léčiv. To by pravděpodobně přispělo i ke zkrácení doby léčby.

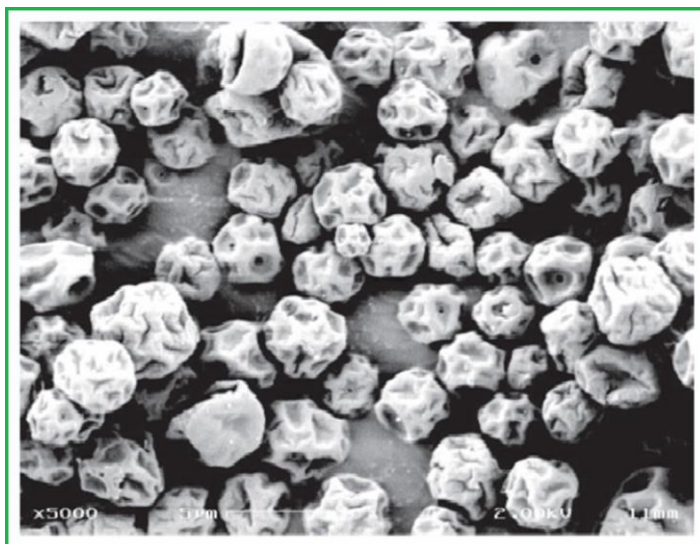
### **Polymer PLGA**

Současný výzkum nosičů antiTBC pro terapii plicní TBC je zaměřen na kopolymer kyseliny glykolové a mléčné (PLGA). Tento nosič je snadno připravitelný a dle dosavadních výzkumů je považován za bezpečný. Přesto má ale své nevýhody. Léčivo se z nosiče uvolňuje rychle, avšak rezidua polymeru zůstávají v plicní tkáni několik týdnů, než podlehnou úplné degradaci. Rozklad tohoto nosiče způsobuje zvýšení kyselosti okolního prostředí, což je nevýhodou pro některá antiTBC náchylná k rozkladu za těchto podmínek (polyanhydridy okolní prostředí neacidifikují, nekumulují se). Jako účinná látka se při výzkumu tohoto nosiče často užívá rifampicin [60][61][61].

PLGA mají hydrofobní povrch, který umožňuje mikrosférám s naadsorbovaným léčivem proniknout hlouběji do plicní tkáně. Hydrofobní povrch PLGA je ale také atraktivní pro proteinové částice, jež se zde kumulují a které z částic nosiče dělají snadný cíl pro fagocyty, odstraňující je z plicní tkáně [59].

## Kapreomycin – porézní částice

Jedním z dalších přístupů v inhalační léčbě je možnost použití objemných částic (LPP) antiTBC kapreomycinu (CAP). Cílem výzkumu inhalovatelných částic kapreomycinu je snížení náročnosti léčby pro pacienty trpící MDR-TBC. V tomto případě se v léčbě postupuje podáním antiTBC druhé linie. Nezřídka se jedná o injekční podání CAP, což je spojeno s bolestivým vjemem pro pacienta. Při injekčním podání tohoto léčiva se mohou také objevit některé nežádoucí účinky (nefrotoxicita, anémie, atd.) Z tohoto důvodu Garcia-Contreras [62] a kol. navrhl kapreomycin-sulfátové částice k inhalaci (Obr. 6). Během testů na morčatech ověřil jejich efektivitu a při jejich použití nezaznamenal nežádoucí účinky [59][62].



**Obr. 6: Sprejem vysušené částice kapreomycinu pod elektronovým mikroskopem.** Převzato se souhlasem: Garcia-Contreras L, Fiegel J, Telko MJ, et al. Inhaled large porous particles of capreomycin for treatment of tuberculosis in a guinea pig model [63].

## RIF-MAN mikročástice

Mezi další inhalovatelný nosič patří mikročástice alkoholického cukru mannitolu, získávaného z cukerné šťávy z kůry kmenů jasanu (*Fraxinus ornus*). Mizoe [64] a kol. tento systém (na nosiči navázán RIF) úspěšně připravil a vyzkoušel. Nosič se ukázal být velice výhodný, zejména pro schopnost rychlého a efektivního uvolnění RIF z nosiče do plicní tkáně. Toto antiTBC je ale krevním řečištěm z plic poměrně rychle odplavováno. Výhodou je snadná a rychlá příprava těchto mikročástic [59][64].



### **PLA - mikročástice**

Přípravou mikročástic kyseliny polymléčné (PLA) s navázanými antiTBC isoniazidem a rifampicinem se zabývá Sharma [65] a kol. Tyto částice jsou schopné se cíleně vázat na plicní makrofágy obsahující *M. tuberculosis*. Vaznost těchto částic na plicní epitel je poměrně nízká. Poměr antiTBC v tomto systému činí 2:1 ve prospěch isonizidu ku rifampicinu [59][65].

### **PEG kopolymer**

Fu [66] a kol. navrhl ether-anhydridové kopolymery PEG ( $C_{2n}H_{4n} + 2O_{n+1}$ ) složené z monomerních částic polyethylenglykolu a kyseliny sebakové (kys. dekadiová). Jedná se o polymery využitelné jak v průmyslové výrobě, tak v medicíně. Vzhledem k molekulové hmotnosti je také lze nazývat jako polyoxyethyleny [66]. Kyselina sebaková  $(HOOC)(CH_2)_8(COOH)$  je přírodní dikarboxylová kyselina. V čisté podobě se jedná o bílý prášek, může ale mít i vločkovitou strukturu. PEGy vykazují v závislosti na struktuře kopolymeru různou dobu degradace. Jedná se o několik málo hodin až několik týdnů. Mají také vhodné vlastnosti k přenosu léčiv do různých částí plic. To z nich dělá slibné kandidáty pro transport léčiv do plicní tkáně. Fu vyvinul PEGy za účelem předcházení nedostatků již zkoušených nosičů, zejména nosiče PLGA. Také dokázal, že PEGy o molekulové hmotnosti větší než 10 kDa jsou vhodné k výrobě mikročástic poskytujících cílenou léčbu plicní TBC [59][66].

### **Glukan polymer**

Glukanové částice (GPs) jsou tvořené polysacharidem složeným z molekul glukózy. Jedná se o oblé duté částice o velikosti 2-4  $\mu\text{m}$ , získávané z pekařských kvasnic z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [67][68].

Jejich povrch obsahuje hlavně 1,3- $\beta$ -glukan. Tyto částicové nosiče mohou být snadno fagocytovány makrofágy díky jejich glukanovým receptorům. Soto [67] a kol. ve svém výzkumu využil právě tento nosič, který naplnil antiTBC rifampicinem. Výsledkem mu byly kapsle porézní struktury. K uzavření pórů použil alginátový a chitosanový hydrogel se záměrem prodloužit dobu uvolňování léčiva. Experimentálně pak změřil, že takto upravená kapsle dokáže uvolňovat léčiva 24-72 hodin [59][67].

### **Želatina - nanočástice**

Želatinové nanočástice představují další systém transportu léčivých látek do organismu. Jedná se o peptidy a proteiny získané částečnou hydrolyzou kolagenu. Tento nosič je stejně jako např. chitosan či algináty zařazen mezi přírodní polymerní excipienty. Želatinové nosiče mají značné výhody. Je to zejména jejich biokompatibilita, biodegradabilita, nízká antigenicita, snadné použití pro parenterální podání a v neposlední řadě nenákladnost přípravy. Tyto nanočástice byly vyvinuty pro cílené a pozvolné uvolňování léčiv. Saraogi [69] a kol. získal metodou jednoduchého vysoušení nanočástice o velikosti kolem 264 nm. Saraogi naplnil částice rifampicinem a dosáhl kontrolovaného uvolňování antiTBC po dobu až 72 hodin. Želatinové nanočástice se ukázaly být velmi efektivním transportérem se zlepšenou biodostupností [59][69][70].

### **Zein**

Zein je protein získávaný ze zrn kukuřice seté (*Zea mays*) [71][72]. V čisté podobě se jedná o žlutý prášek. Tento protein je tradičně hojně využíván v průmyslové výrobě. Metha [73] a kol. se ve svém výzkumu zabýval přípravou mikrosfér naplněných léčivou první linie (RIF, INZ, PZA). Proces přípravy mikrosfér je velmi jednoduchý, snadno reprodukovatelný a nenáročný na technické vybavení. Mikrosféry se jako celek ukázaly být stabilní a snadno uvolňovaly účinnou látku. Jedná se o slibný přístup k léčbě inhalační formou. Systém je nadále testován [71][73].

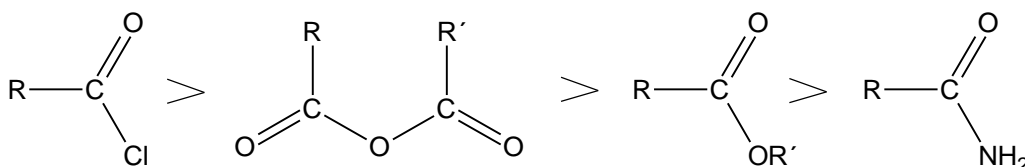
### 3. Chemické obměny pyrazinu a jemu podobných jader

#### 3.1. Příprava derivátů karboxylových kyselin

Reakce na uhlíku karboxylových kyselin a jejich derivátů probíhají adičně-eliminacním mechanismem, jedná se v podstatě o nukleofilní substituci. Vše se odehrává na uhlíkovém atomu acylové skupiny.

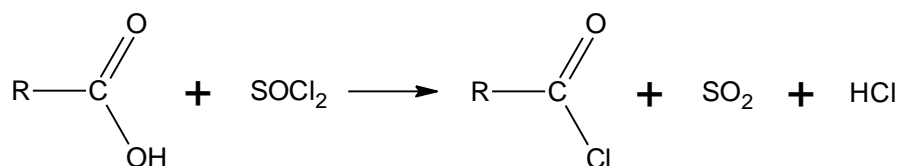
Karboxylová skupina umožňuje vznik následujícím funkčním derivátům: soli karboxylových kyselin, acylhalogenidy, anhydridy, estery, amidy, imidy a nitrily.

Obecně lze říct, že z reaktivnějších acyl derivátů lze získat deriváty méně reaktivní. Opačný proces lze provést velmi obtížně, a pokud je to možné, tak za použití speciálních reagensů. Odstupující skupina je v případě reaktantu aktivnější než ta u produktu [74]. Relativní reaktivita některých derivátů je následující:

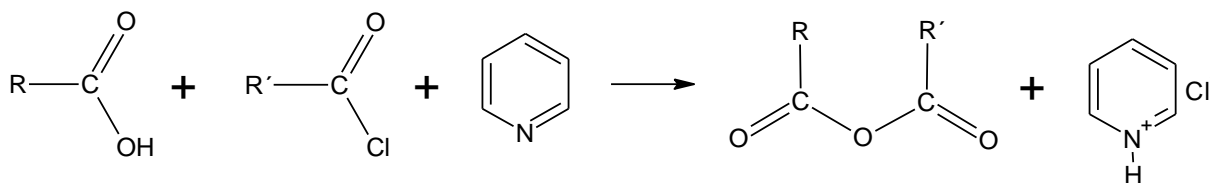


#### Příprava některých funkčních derivátů karboxylových kyselin:

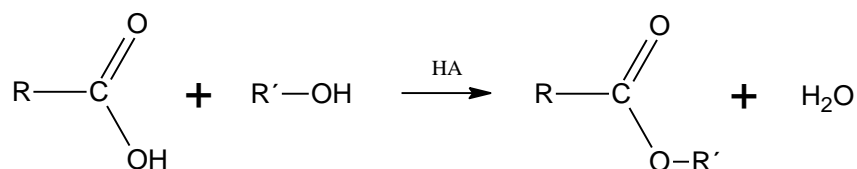
**Acylchloridy** jsou nejčastěji připravovanými acylhalogenidy, jež jsou nejreaktivnější ze všech derivátů. Lze je připravit za použití speciálních činidel, jako jsou  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{PCl}_3$ ,  $\text{PCl}_5$ . Volba činidla závisí na dalším způsobu zpracování reakční směsi. Pro příklad uvádím reakci s thionylchloridem ( $\text{SOCl}_2$ ) [74]:



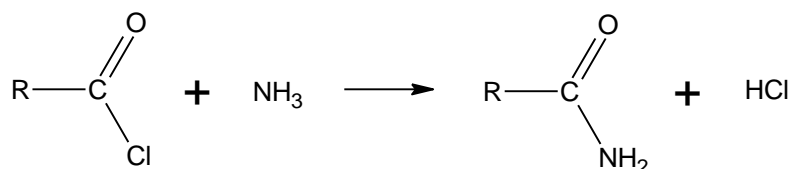
**Anhydridy** se obecně připravují acylací alkalických solí chloridy kyselin. Tyto funkční deriváty lze vytvořit ze dvou molekul karboxylové kyseliny, avšak pouze za přítomnosti silného dehydratačního činidla (acetanhydrid, trifluoracetanhydrid, DCC, aj.). Vznikají při reakcích karboxylových kyselin s reaktivními acylchloridy za přítomnosti pyridinu (deprotonační činidlo) [74][75]:



**Estery** lze připravit acylací alkoholů reaktivními činidly, jako jsou chloridy či anhydridy kyselin. Další metodou přípravy je alkylace karboxylátového iontu při reakci karboxylových kyselin s diazoalkany. Nejuniverzálnější a také neúčinnější metodou přípravy esterů je však esterifikace v kyselém prostředí. Jedná se o reverzibilní reakci. Pro zajištění kyselosti se do reakčního prostředí obvykle přidává  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [74][75]:



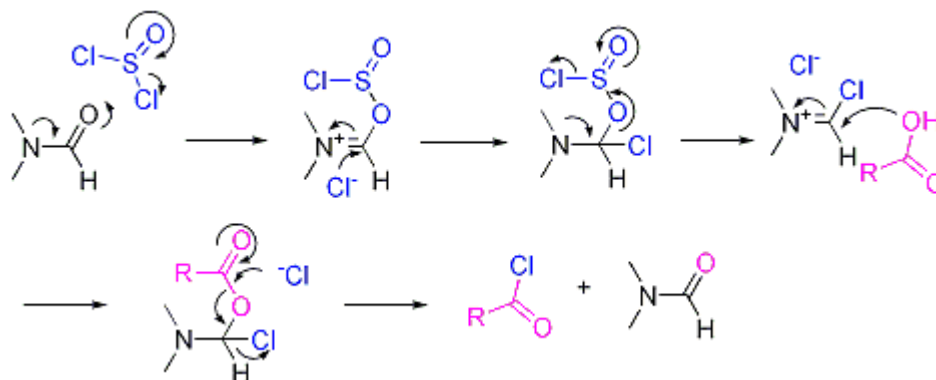
**Amidy** pak vznikají acylací amoniaku nebo primárních či sekundárních aminů reaktivnějšími deriváty (acylchloridy, anhydridy, estery). Zde uvádím acylaci amoniaku za použití acylchloridu [74]:



### 3.2. *Substituce hydroxylové skupiny za atom chloru na pyrazinu a jemu podobných jádrech*

Na **pyrazin**ovém jádře se tato substituce dá zrealizovat použitím činidla  $\text{POCl}_3$  (trichlorid fosforylu). Tato reakce byla provedena a Al-Awardim [76] a kol. (zahřívání, 0,67 hod., výtěžnost 84 %). Na **pyridin**u tuto reakci předvedl Sugimoto [77] a kol. za použití *N*-chlorsukcinimidu a  $\text{PPh}_3$  (triethylfosfinu) v prostředí 1,4-dioxanu (zahřívání, 4 hod., výtěžnost 43 %). Sun [78] a kol. v roce 2011 použil  $\text{POCl}_3$  spolu s nesubstituovaným pyridinem a dosáhl výtěžnosti až 90 % ( $t = 180\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P = 150,015\text{-}900,09\text{ Torr}$ , 2 hod.). Kijrunghpaiboon [79] a kol. poté v roce 2012 reakci s  $\text{PPh}_3$  zefektivnil. Spolu s uvedeným činidlem použil ještě trichloracetonitril v prostředí toluenu. Reakce probíhala pod refluxem (4 hod.) a bylo dosaženo takřka 100 % výtěžnosti. **Pyridazin** takto substituoval již v roce 1909 Gabriel [80] za použití  $\text{POCl}_3$ . Reakci lze provést také na neheterocyklickém jádře **benzenu**. Pro tuto reakci použil Autenrieth [81] v roce 1908  $\text{PCl}_5$  (chlorid fosforečný), reakce probíhala při  $200\text{-}210\text{ }^\circ\text{C}$ . V roce 1990 pak tato substituci provedl Bay [82] a kol. pomocí tetrachlorfenylfosforanu  $\text{PhPCl}_4$  ( $t = 160\text{ }^\circ\text{C}$ , výtěžnost 76 %).

V experimentální části této práce byla pro přípravu reaktivního acylchloridu a zároveň substituci hydroxylové skupiny na pyrazinovém jádře použita reakce, kterou předvedl v roce 2005 Matulenko [83] a kol. s činidlem  $\text{SOCl}_2$  (zahřívání, 16 hod.) za katalýzy dimethylformamidem (DMF). V tomto případě katalyzátor nejprve reaguje s  $\text{SOCl}_2$  za vzniku reaktivního činidla (struktura iminu), jenž pak reaguje s karboxylovou skupinou. Při této reakci činidlo odebírá kyslík z hydroxylové skupiny, ten je nahrazen atomem chloru a DMF regeneruje (Obr. 7) [84].



Obr. 7: Syntéza acylchloridu za katalýzy DMF . Převzato dle [84].

### 3.3. Substituce atomu chloru za aminovou (alkylaminovou) skupinu na pyrazinu a jemu podobných jádrech

Substituci atomu chloru za aminovou skupinu na **pyrazinu** předvedl již v roce 1946 Erickson [85] a kol. za pomoci amoniaku ve vodném prostředí ( $t = 200\text{ }^\circ\text{C}$ ). V roce 2010 pak Henderson [86] a kol. použil amoniak v DMSO ( $t = 130\text{ }^\circ\text{C}$ ). Ostatní dusíkaté heterocykly se dají substituovat podobným způsobem.

Methylamin lze substituovat na **pyrazinové** jádro v prostředí DMSO při  $130\text{ }^\circ\text{C}$  (Henderson [86] a kol.). Pro substituci **pyridinu** byl společně s metylaminem použit *tert*-butanolát sodný v prostředí toluenu ( $t = 65\text{ }^\circ\text{C}$ , 4 hod., inertní atmosféra) při 97 % výtěžnosti (Lundgren [87] a kol.).

Při těchto reakcích je výhodné chlorovodík odstupující z aromatického jádra navázat na amin (musí být v nadbytku) nebo na silnou bázi. Pokud je zásada indiferentní, nereaguje již s aromátem, ale pouze s odstupující  $\text{HCl}$ . Tímto lze dosáhnout zvýšení výtěžnosti a rychlosti reakce. Mezi silné indiferentní organické báze lze uvést TEA, pyridin, *tert*-butanolát sodný a jiné. Z anorganických lze například použít  $\text{KCO}_3$ .

## IV. Experimentální část

### 4. Přístroje, chemikálie, použité analytické metody

Výchozí látky byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo).

Pro sledování a kontrolu průběhu syntetických reakcí byla užitá metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Byla použita vyvíjející soustava typu: hexan – ethylacetát (2:1). Vlastní analýza byla provedena na TLC deskách Merck (Darmstadt, Německo), Silica gel 60 F<sub>254</sub>. Detekce byla prováděna pod UV lampou emitující záření o vlnové délce 254 nm.

U chemikálií, použitých pro uvedené reakce, byly ověřeny základní fyzikální konstanty. Rozpouštědla použitá pro přípravu výchozích látek (toluen, aceton) byla řádně vysušena a vyčištěna. Pro přípravu finálních struktur byl použit běžný, komerčně dostupný ethanol.

Připravované produkty byly separovány pomocí preparativního chromatografu CombiFlash® Rf (Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA). Teplota tání již čistého produktu byla stanovena v otevřené kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP30 (Bibby Sterling LTD, UK) a hodnoty jsou nekorigované.

Infračervená spektra připravených sloučenin byla získána metodou zeslabené totální reflektance (ATR) na Ge krystalu na přístroji Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) na Katedře anorganické a organické chemie (KAOCH).

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla změřena také na KAOCH a to pomocí spektrometru Varian Mercury VX-BB 300 a Varian VNMR S500 (Varian Corp., Palo Alto, CA, USA). Spektra byla zaznamenána v deuterovaném CDCl<sub>3</sub> nebo DMSO při laboratorní teplotě a při frekvenci 300 MHz pro <sup>1</sup>H a 75 MHz pro <sup>13</sup>C, respektive 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C za pomoci doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách ppm a jsou nepřímo vztaheny k tetramethylsilanu (TMS).

Hmotnostní spektra finálních produktů byla změřena v roztoku obsahujícím methanol, vodu a mravenčí kyselinu v poměru 80:20:0.02 v/v za použití LCQ Advantage Max ion-trap hmotnostního spektrometru (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) při pozitivní ionizaci elektrosprejem.

Všechny chemické vzorce byly vytvořeny a získány pomocí programu ACD/Chemsketch, verze 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada).

Pro zjištění míry lipofility získaných sloučenin byly vypočteny jejich  $\log P$  a  $\text{Clog } P$  pomocí programu CS ChemBioOffice Ultra, verze 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

### **Experimentální měření lipofility**

Pro získání experimentálních hodnot lipofility ( $\log k$ ) byl použit kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1200 SL s detektorem diodového pole SL G1315C (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA). Při měření byla použita předkolona ZORBAX XDB-C18 5  $\mu\text{m}$ , 4 x 4 mm, Part No. 7995118-504 (Agilent Technologies Inc.), jako kolona pak ZORBAX Eclipse XDB-C18 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc.). Proces rozdělování byl monitorován pomocí Agilent ChemStation (verze B.04.02), zahrnující spektrální modul (Agilent Technologies Inc.). Mobilní fáze byla směs MeOH (70 %) a vody (30 %). Pro samotný experiment byly nastaveny následující parametry: průtok kolonou 1,0 ml/min, nástřik vzorku 20  $\mu\text{l}$ , teplota kolony 30 °C, detekce při vlnové délce 210 nm a nastavení monitorovací vlnové délky 270 nm. Retenční čas ( $t_R$ ) byl měřen v minutách. Kapacitní faktor  $k$  byl vypočten podle vzorce  $k = (t_R - t_D)$ , kde  $t_R$  je retenční čas dané látky a  $t_D$  je mrtvý čas kolony měřený jako retenční čas methanolického roztoku jodidu draselného.  $\log k$  je dekadickým logaritmem kapacitního faktoru  $k$ .

## 5. Postup biologických hodnocení

### 5.1. Testování antimykobakteriální aktivity

Test byl proveden mikrodiluční metodou na mikrotitračních destičkách. Výsledky byly odečteny vizuálně. Nové látky byly testovány *in vitro* na aktivitu vůči *M. avium* ssp. *avium* Chester CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73, *M. kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 a *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88. Všechny tyto kmeny byly zakoupeny od České národní sbírky typových kultur (CNCTC) při Státním zdravotním ústavu. Sloučeniny byly rozpuštěny a naředěny dvojkovým ředěním v DMSO, smíseny s růstovým médiem Šulovou půdou o pH = 5,6 (Trios, Praha) na konečné koncentrace 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 µg/ml. Dále byly mykobakteriální suspenze upraveny pro každý jednotlivý kmen naředěním na  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  (získány ze suspenze o hodnotě 0,5-1,0 McFarlandovy stupnice). Těmito suspenzemi se inokulovaly mikrotitrační destičky. Každá látka byla testována dvakrát a to při dvou různých koncentracích mykobakteriální suspenze. Testovaná mykobakteria byla kultivována v inkubátoru při  $36 \pm 1$  °C po dobu 10-14 dnů, dokud nebyl jejich nárůst dostatečný (ve srovnání s kontrolní jamkou). MIC [µg/ml] byla odečtena jako nejnižší koncentrace testované látky, jež je schopna inhibovat růst mykobakterií. Jako standard byl při testování použit PZA a INH.

*Poznámka:* Vybrané látky, jež při testování vykazaly významnou antimykobakteriální aktivitu (MIC = 1,56 – 3,13 µg/ml), byly znovu testovány při nižších koncentracích v řadě 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 – 0,78 – 0,39 µg/ml). Standardem byl v tomto případě INH.

### 5.2. Testování antifungální aktivity

Připravené sloučeniny byly testovány na antifungální aktivitu *in vitro* za použití mikrodilučního bujónového testu. Nové látky byly testovány na aktivitu vůči *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM). Látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny v RPMI 1640 médiu s glutaminem. Koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesahovala 2,5 % (v/v) celkového složení roztoku. Statický způsob inkubace byl proveden v glutaminovém médiu při pH = 7,0



v humidní atmosféře při 35 °C. Délky inkubace byla 24 a 48 hodin (pro *Trichophyton mentagrophytes* 72 a 140 hodin). Jako standardy byly použity flukonazol (FLU) a amfotericin B (AMB).

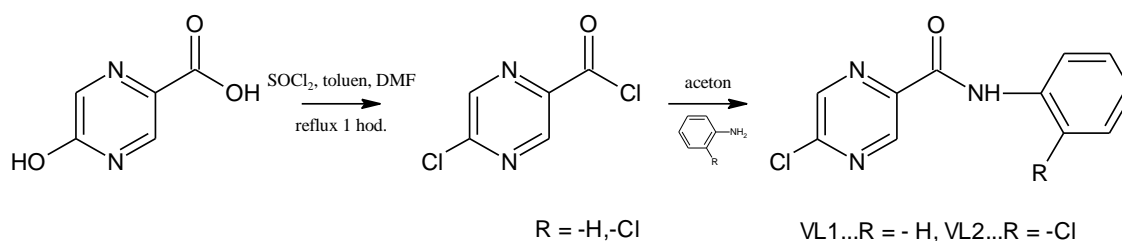
### **5.3. Testování antibakteriální aktivity**

I v tomto případě byla použita metoda mikrodilučního bujónového testu. Některé bakteriální kmeny, použité pro testování, byly získány od České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně. Tyto kmeny jsou doporučované jako standardy pro výzkum antibakteriální aktivity. Jsou to *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Další bakteriální kmeny vhodné pro test byly klinické izoláty *Staphylococcus aureus* H 5996/08-meticilin resistantní (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL pozitivní. Všechny pocházely z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Všechny zkoušené kmeny byly vykultivovány na Mueller-Hintonovu agaru při teplotě 35 °C a následně udržovány na stejném mediu při 4 °C. Vypěstovaná bakteriální inokula byla pak suspendována v sterilním 0,85 % solném roztoku a hustota suspenze byla upravena na 0,5 dle McFarlanda. Tato suspenze byla poté použita k inokulaci. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO. Jejich aktivita se stanovovala v Mueller-Hintonovu bujónu při pH = 7,0. Koncentrace DMSO v testovacím mediu nepřesahovala 1 % (v/v) celkového složení roztoku a pomocí kontrol bylo prokázáno, že tato koncentrace DMSO neovlivňovala růst bakterií. Hodnota MIC, definovaná jako 95 % inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s kontrolním vzorkem, byla odečítána po 24 a 48 hodinách statické inkubace při 35 °C. Jako standardy byly použity penicilin G (PEN), ciprofloxacin HCC (CIP), fenoxymethylpenicilin (PHE).

## 6. Postup přípravy 5-alkylamino- derivátů substituovaného pyrazin-2-karboxamidu

### Příprava výchozích látek (obr. 8):

Potřebné množství výchozí látky 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové kyseliny bylo dispergováno v 50 ml bezvodého toluenu, následně byl přidán  $\text{SOCl}_2$  a 10 kapek DMF jako katalyzátoru [83]. Reakce probíhala pod refluxem (termostat nastaven na  $115\text{ }^\circ\text{C}$ ) přibližně 1 hodinu do zreagování výchozí látky. Směs během reakce postupně hnědla, ubývalo pevné výchozí látky. Po skončení reakce byla reakční směs ponechána mírně vychladnout, poté byl toluen a zbytek  $\text{SOCl}_2$  odpařen na odparce. Tento proces byl 2-3 krát opakován s cílem zbavení se zbývajících  $\text{SOCl}_2$ . Vzniklý roztok chloridu kyseliny (červenohnědá kapalina) byl naředěn 10 ml acetonu, příslušný anilin (0,8 molárního ekvivalentu) byl rozpuštěn v 20 ml acetonu s 1,5 ekvivalentem triethylaminu (TEA). Poté byl do roztoku anilinu s TEA za stálého míchání přikapáván roztok chloridu kyseliny, mícháno přibližně hodinu, ponecháno do druhého dne. V konečné fázi byl aceton odpařen na odparce, pevná látka byla promyta na filtru vodou kvůli odstranění vzniklé soli triethylamonium chloridu. Toto promytí částečně odstranilo i nezreagovaný podíl anilinu, resp. 2-chloranilinu, což jsou kapaliny omezeně mísitelné s vodou. Pevný zbytek byl vysušen, neadsorbován na silikagel, odseparován prostřednictvím preparativního chromatografu CombiFlash® Rf. Frakce obsahující produkt byly spojeny a rozpouštědla oddestilována za sníženého tlaku.



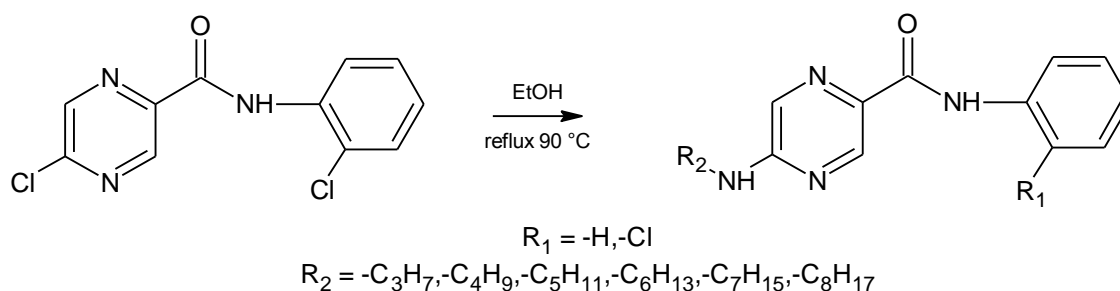
**Obr. 8:**

*Poznámka:* Pro reakci s nesubstituovaným anilinem byly použity 2 g 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové kyseliny (0,014 mol; 1 ekv.), 8 ml  $\text{SOCl}_2$ , 1,06 g anilinu (0,011 mol; 0,8 ekvivalentu) a 2,2 g TEA (0,021 mol; 1,5 ekvivalentu). 5-chlor-N-fenylpyrazin-2-karboxamid (**VL1**) byl izolován jako bílá pevná látka s teplotou tání  $156,9\text{--}158,2\text{ }^\circ\text{C}$  (dle Zitka a kol. - nepublikovaná data  $157,2\text{--}158,4\text{ }^\circ\text{C}$ ). Výtěžek chromatograficky čistého produktu byl 2,5 g, tj. cca 75 % teoretického výtěžku.

Pro reakci s 2-chloranilinem bylo použito 1,5 g 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové kyseliny (0,011 mol; 1 ekv.), 5 ml SOCl<sub>2</sub>, 1,1 g 2-chloranilinu (0,008 mol; 0,8 ekvivalentu) a 1,63 g TEA (0,016 mol; 1,5 ekvivalentu). 5-chlor-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid (**VL2**) byl izolován jako bílá pevná látka s teplotou tání 149,5-151,0 °C (dle Zitka a kol. - nepublikovaná data 149,1-150,6 °C). Výtěžek chromatograficky čistého produktu byl 1,58 g, tj. cca 55 % teoretického výtěžku.

### Finální příprava cílových struktur (obr 9):

230 mg 5-chlor-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu VL1 (1 mmol; 1 ekv.), resp. 270 mg 5-chlor-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidu VL2 (1 mmol; 1 ekv.) bylo částečně rozpuštěno v 25 ml ethanolu (definitivně rozpuštěno až po zahřátí), poté byl najednou přidán příslušný alkylamin (3 ekv.) spolu s TEA (1 ekv.). Celá směs byla zahřívána při teplotě 90 °C pod zpětným chladičem za průběžné kontroly na TLC. Při této metodě chromatografie byla použita mobilní fáze hexan – ethyl-acetát v poměru 2:1. Reakce byla ukončena při detekci čistého produktu, či po zajištění dostatečného množství výsledného produktu. Reakční směs byla naadsorbována na silikagel, následovalo provedení chromatografie (CombiFlash® Rf). Chromatografie probíhala za použití mobilní fáze hexan – ethyl-acetát (gradientová eluce) – 10-35 % ethyl-acetátu pro sérii 2-chloranilinu (JZ-102 až JZ-107), 10-50 % pro sérii nesubstituovaného anilinu (JZ-96 až JZ-101); detekce 280 nm, monitorovací vlnová délka 260 nm. Frakce obsahující produkt byly slity, rozpouštědla byla za sníženého tlaku odpařena a pevná látka byla poté vysušena v exsikátoru.



Obr. 9

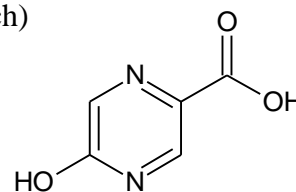
*Poznámka:* \*) množství VL2 pro látku JZ-103 činilo 300 mg

V případě propylaminu bylo použito 6 ekvivalentů za účelem zrychlení reakce a 1 ekvivalent TEA. Po prvním naadsorbování na silikagel byl v případě propyl- a butylaminu ještě přidán toluen, směs byla odpařena (snaha odstranit přebytek aminu). Opakováno 2-3 krát.

## 7. Výchozí látky

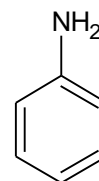
### 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_5H_4N_2O_3$
- molekulová hmotnost: 140,10 g/mol
- log  $P$ : -0,33
- Clog  $P$ : 0,732



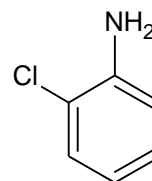
### anilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_6H_7N$
- molekulová hmotnost: 93,13 g/mol
- log  $P$ : 0,90
- Clog  $P$ : 0,811



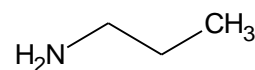
### 2-chloranilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_6H_6ClN$
- molekulová hmotnost: 127,57 g/mol
- log  $P$ : 1,91
- Clog  $P$ : 1,908



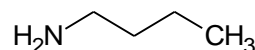
### propylamin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_3H_9N$
- molekulová hmotnost: 59,11 g/mol
- log  $P$ : 0,17
- Clog  $P$ : 0,394



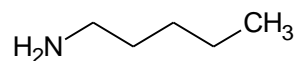
### butylamin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_4H_{11}N$
- molekulová hmotnost: 73,14 g/mol
- log  $P$ : 0,59
- Clog  $P$ : 0,923



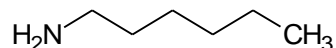
**pentylamin** (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_5H_{13}N$
- molekulová hmotnost: 87,16 g/mol
- log  $P$ : 1,01
- Clog  $P$ : 1,452



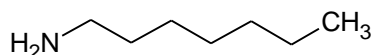
**hexylamin** (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_6H_{15}N$
- molekulová hmotnost: 101,20 g/mol
- log  $P$ : 1,42
- Clog  $P$ : 1,981



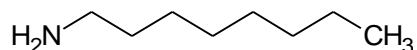
**heptylamin** (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_7H_{17}N$
- molekulová hmotnost: 115,22 g/mol
- log  $P$ : 1,84
- Clog  $P$ : 2,510



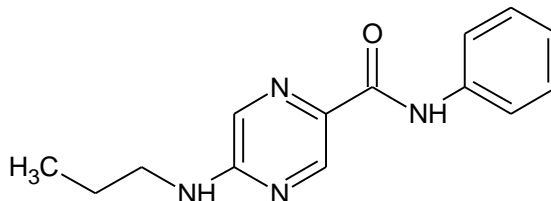
**oktylamin** (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec:  $C_8H_{19}N$
- molekulová hmotnost: 129,24 g/mol
- log  $P$ : 2,26
- Clog  $P$ : 3,039



## 8. Nově připravené látky

### *N*-fenyl-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid



- **sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 256,30 g/mol

- **log *k*:** 0,365

- **log *P*:** 1,63

- **Clog *P*:** 3,345

- **teplota tání:** 130,0–131,3 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 252 mg

**praktická:** 155 mg (61,51 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3339, 3292, 2956, 2933, 2874, 1665, 1594, 1525, 1443, 1272, 1195, 1007, 749, 689.

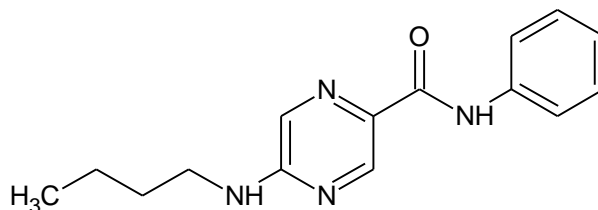
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO) δ 10.07 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.96 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.89 – 7.80 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.41 – 7.24 (m, 2H, H3', H5'), 7.10 – 7.01 (m, 1H, H4'), 3.37 – 3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.57 (h, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO) δ 162.57, 156.37, 143.16, 138.95, 131.88, 131.24, 128.75, 123.52, 120.13, 42.29, 22.00, 11.66.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 257,03 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-96

## 5-(butylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid



- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 270,33 g/mol

- **log *k*:** 0,569

- **log *P*:** 2,04

- **Clog *P*:** 3,874

- **teplota tání:** 133,8–134,7 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 266 mg

**praktická:** 142 mg (53,38 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3337, 3271, 2952, 2928, 2886, 1662, 1595, 1524, 1442, 1242, 1194, 1007, 751, 689.

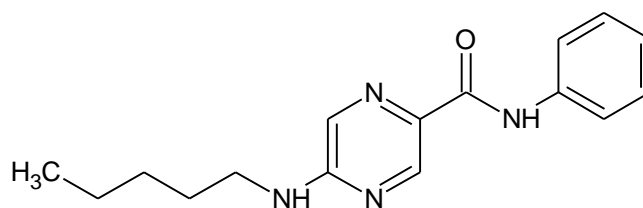
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO) δ 10.07 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.90 – 7.75 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.41 – 7.24 (m, 2H, H3', H5'), 7.14 – 6.97 (m, 1H, H4'), 3.44 – 3.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.62 – 1.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.45 – 1.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO) δ 162.57, 156.34, 143.16, 138.95, 131.85, 131.23, 128.75, 123.51, 120.12, 40.54, 30.82, 19.85, 13.88.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 271,04 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-97

## ***N*-fenyl-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 284,36 g/mol

- **log *k*:** 0,783

- **log *P*:** 2,46

- **Clog *P*:** 4,403

- **teplota tání:** 126,3–131,3 °C

- **vzhled:** světle béžová pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 280 mg

**praktická:** 252 mg (90,00 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3311, 2957, 2933, 2873, 1655, 1596, 1530, 1443, 1279, 1200, 1011, 753, 691.

- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (s, 1H, CONH), 8.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.79 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.75 – 7.68 (m, 2H, H2', H6'), 7.42 – 7.29 (m, 2H, H3', H5'), 7.17 – 7.06 (m, 1H, H4'), 5.46 (bs, 1H, NH), 3.48 – 3.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 – 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.45 – 1.28 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

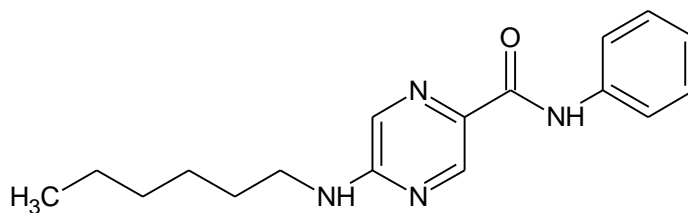
- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.94, 155.49, 142.86, 137.87, 132.94, 129.30, 128.98, 123.99, 119.54, 41.66, 28.99, 28.89, 22.32, 13.93.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 285,04 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-98



## ***N*-fenyl-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 298,38 g/mol

- **log *k*:** 1,009

- **log *P*:** 2,88

- **Clog *P*:** 4,932

- **teplota tání:** 128,7–129,6 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 294 mg

**praktická:** 216 mg (73,47 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3346, 3316, 3272, 2948, 2928, 2859, 1655, 1598, 1521, 1443, 1278, 1195, 1012, 751, 690.

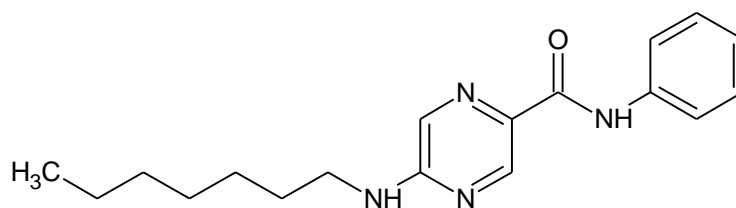
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (bs, 1H, CONH), 8.88 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 7.79 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.75 – 7.68 (m, 2H, H2', H6'), 7.41 – 7.31 (m, 2H, H3', H5'), 7.16 – 7.07 (m, 1H, H4'), 5.40 (bs, 1H, NH), 3.50 – 3.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47 – 1.24 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.95, 155.57, 142.99, 137.92, 133.04, 129.18, 128.98, 123.97, 119.54, 41.70, 31.42, 29.20, 26.55, 22.52, 13.96.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 299,06 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-99

## ***N*-fenyl-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 312,41 g/mol

- **log *k*:** 1,238

- **log *P*:** 3,29, **Clog *P*:** 5,461

- **teplota tání:** 125,7–126,9 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 308 mg

**praktická:** 243 mg (78,90 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3346, 3306, 3268, 2948, 2928, 2857, 1666, 1600, 1521, 1443, 1279, 1196, 1013, 752, 690.

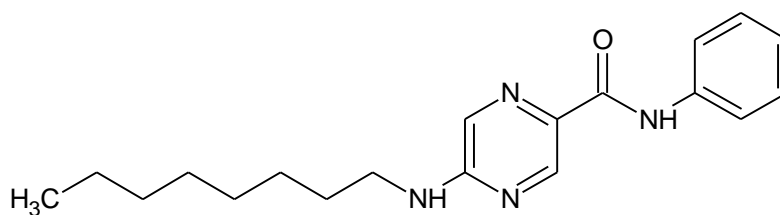
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (bs, 1H, CONH), 8.89 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 7.78 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.76 – 7.68 (m, 2H, H2', H6'), 7.41 – 7.31 (m, 2H, H3', H5'), 7.16 – 7.07 (m, 1H, H4'), 5.29 (bs, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 3.48 – 3.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.19 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.96, 155.64, 143.15, 137.94, 133.09, 128.99, 123.96, 119.53, 41.69, 31.69, 29.27, 28.93, 26.85, 22.54, 14.03. Chybí jeden aromatický a jeden alifatický uhlík.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 313,07 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-100

## ***N*-fenyl-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 326,44 g/mol

- **log *k*:** 1,465

- **log *P*:** 3,71

- **Clog *P*:** 5,990

- **teplota tání:** 123,4–124,8 °C

- **vzhled:** světle béžová pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 321mg

**praktická:** 100 mg (31,15 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3337, 3283, 2956, 2927, 2853, 1663, 1595, 1525, 1444, 1279, 1194, 1010, 750, 694.

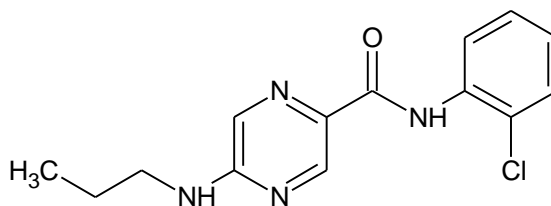
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (s, 1H, CONH), 8.89 (d, *J* = 1.3 Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 7.83 – 7.66 (m, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>2</sub>′, H<sub>6</sub>′), 7.42 – 7.30 (m, 2H, H<sub>3</sub>′, H<sub>5</sub>′), 5.32 (bs, 1H, NH), 3.48 – 3.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.73 – 1.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.21 (m, 10H, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>), 0.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.97, 155.63, 143.14, 137.94, 133.08, 128.99, 123.96, 119.53, 41.70, 31.74, 29.26, 29.22, 29.16, 26.89, 22.60, 14.05. Chybí jeden aromatický uhlík.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 327,08 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-101

## ***N*-(2-chlorfenyl)-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 290,75 g/mol

- **log *k*:** 0,840

- **log *P*:** 2,18

- **Clog *P*:** 3,240

- **teplota tání:** 209,9–210,9 °C

- **vzhled:** světle béžová pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 293 mg

**praktická:** 224 mg (76,45 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3312, 2967, 2937, 2881, 1668, 1592, 1520, 1442, 1270, 1196, 1011, 749, 681.

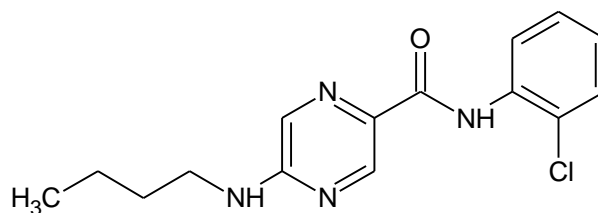
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO) δ 9.97 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.39 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, H6'), 8.01 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.94 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.53 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H3'), 7.43 – 7.31 (m, 1H, H5'), 7.20 – 7.07 (m, 1H, H4'), 3.34 – 3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.66 – 1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO) δ 161.95, 156.62, 143.28, 134.83, 131.76, 130.73, 129.46, 128.09, 124.99, 123.19, 121.52, 42.34, 21.94, 11.65.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 291,05 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-102

## 5-(butylamino)-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid



- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 304,77 g/mol

- **log *k*:** 1,053

- **log *P*:** 2,60, **Clog *P*:** 3,769

- **teplota tání:** 199,2–199,9 °C

- **vzhled:** světle béžová pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 341 mg

**praktická:** 246 mg (72,14 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3323, 2962, 2930, 2873, 1667, 1590, 1516, 1441, 1272, 1194, 1011, 754, 681.

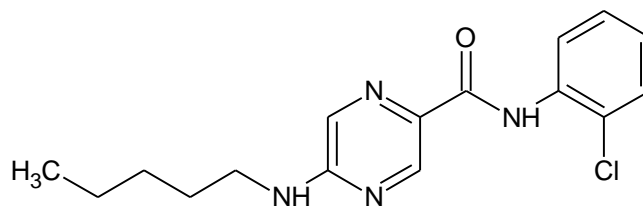
- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO) δ 9.96 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.39 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.52 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H, H3'), 7.42 – 7.31 (m, 1H, H5'), 7.18 – 7.08 (m, 1H, H4'), 3.39 – 3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.60 – 1.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.43 – 1.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO) δ 161.95, 156.60, 143.29, 134.84, 131.78, 130.71, 129.46, 128.09, 124.97, 123.17, 121.50, 30.75, 19.85, 13.87. Jeden alifatický uhlík skryt pod signálem DMSO.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 305,06 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-103

## ***N*-(2-chlorfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 318,80 g/mol

- **log *k*:** 1,274

- **log *P*:** 3,02

- **Clog *P*:** 4,298

- **teplota tání:** 196,4–197,1 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 321 mg

**praktická:** 195 mg (60,75 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3348, 3324, 2959, 2929, 2857, 1671, 1591, 1520, 1442, 1269, 1193, 1011, 755, 695.

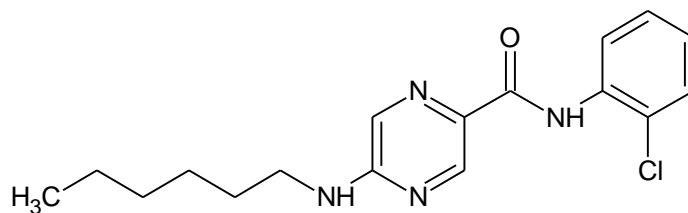
- **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 9.97 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H3), 8.39 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.98 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.94 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.53 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.41 – 7.34 (m, 1H, H5'), 7.17 – 7.10 (m, 1H, H4'), 3.37 – 3.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.60 – 1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.36 – 1.26 (m, 4H, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 161.93, 156.57, 143.27, 134.82, 131.79, 130.70, 129.44, 128.07, 124.97, 123.18, 121.52, 40.49, 28.83, 28.31, 22.05, 14.07.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 319,08 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-104

## ***N*-(2-chlorfenyl)-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 332,83 g/mol

- **log *k*:** 1,502

- **log *P*:** 3,44

- **Clog *P*:** 4,827

- **teplota tání:** 186,6–189,0 °C

- **vzhled:** světle béžová pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 335 mg

**praktická:** 166 mg (49,55 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3348, 3307, 2958, 2929, 2871, 1664, 1592, 1521, 1441, 1270, 1193, 1012, 751, 681.

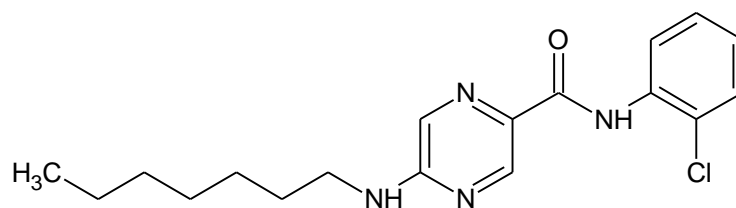
- **<sup>1</sup>H NMR** - obtížně interpretovatelné kvůli špatné rozpustnosti látky při měření.

- **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 161.95, 156.58, 143.28, 134.82, 131.87, 130.70, 129.46, 128.09, 125.01, 123.22, 121.57, 40.54, 31.18, 28.60, 26.32, 22.24, 14.09.

- **hmotnostní spektrometrie:** m/z = 333,05 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-105

## ***N*-(2-chlorfenyl)-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 346,85 g/mol

- **log *k*:** 1,735

- **log *P*:** 3,85

- **Clog *P*:** 5,356

- **teplota tání:** 185,4–185,7 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 349 mg

**praktická:** 194 mg (55,59 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3334, 3308, 2957, 2929, 2872, 1666, 1593, 1518, 1442, 1271, 1193, 1012, 751, 681.

- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.06 (bs, 1H, CONH), 8.88 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.62 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.85 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H5), 7.40 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.35 – 7.25 (m, 1H, H5'), 7.10 – 6.97 (m, 1H, H4'), 5.35 (bs, 1H, NH), 3.50 – 3.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.71 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.49 – 1.22 (m, 8H, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

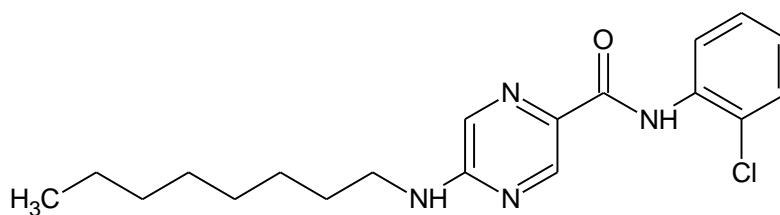
- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.01, 155.54, 143.03, 134.89, 133.15, 129.38, 129.07, 127.69, 124.23, 123.10, 120.97, 41.77, 31.70, 29.28, 28.93, 26.85, 22.56, 14.04.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 347,04 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-106



## ***N*-(2-chlorfenyl)-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid**



- **sumární vzorec:** C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 360,88 g/mol

- **log *k*:** 1,965

- **log *P*:** 4,27

- **Clog *P*:** 5,885

- **teplota tání:** 182,8–183,8 °C

- **vzhled:** bílá pevná krystalická látka

- **výtěžnost reakce**

**teoretická:** 363 mg

**praktická:** 235 mg (64,74 %)

- **IR spektrum (ATR-Ge; cm<sup>-1</sup>):** 3306, 2957, 2927, 2852, 1664, 1593, 1517, 1442, 1271, 1193, 1012, 750, 681.

- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.05 (s, 1H, CONH), 8.88 (s, 1H, H3), 8.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H6'), 7.86 (s, 1H, H5), 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 7.31 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5'), 7.04 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4'), 5.39 (bs, 1H, NH), 3.51 – 3.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.78 – 1.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.49 – 1.18 (m, 10H, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>), 0.88 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.97, 155.45, 142.85, 134.89, 133.17, 129.48, 129.08, 127.70, 124.25, 123.10, 120.98, 41.80, 31.74, 29.26, 29.22, 29.16, 26.88, 22.60, 14.06.

- **hmotnostní spektrometrie:** *m/z* = 361,04 [M+H]<sup>+</sup>

- **označení:** JZ-107

**Tabulka 2:** Interpretace charakteristických pásů infračervených spekter připravených látek ( $\nu$  - valenční vibrace,  $\delta$  - deformační vibrace).

látka	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CH})$			$\nu(\text{C=O})$	$\delta(\text{NH})$
	-CO-NH-; -NH-CH <sub>2</sub> -	alkyl			-CONH-	-CO-NH-
JZ-96	3339, 3292	2956,	2933,	2874	1665	1525
JZ-97	3337, 3271	2952,	2928,	2886	1662	1524
JZ-98	3311	2957,	2933,	2873	1655	1530
JZ-99	3346, 3316, 3272	2948,	2928,	2859	1655	1521
JZ-100	3346, 3306, 3268	2948,	2928,	2857	1666	1521
JZ-101	3337, 3283	2956,	2927,	2853	1663	1525
JZ-102	3312	2967,	2937,	2881	1668	1520
JZ-103	3323	2962,	2930,	2873	1667	1516
JZ-104	3348, 3324	2959,	2929,	2857	1671	1520
JZ-105	3348, 3307	2958,	2929,	2871	1664	1521
JZ-106	3334, 3308	2957,	2929,	2872	1666	1518
JZ-107	3306	2957,	2927,	2852	1664	1517

## 9. Výsledky biologických hodnocení

### 9.1. Antimykobakteriální aktivita

Standardy: PZA – pyrazinamid, INH – isoniazid

Tabulka 3: Výsledky testů - antimykobakteriální aktivita

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )							
	JZ-96	JZ-97	JZ-98	JZ-99	JZ-100	JZ-101	PZA	INH
<i>M. avium</i> 80/72	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	6,25
<i>M. avium</i> 152/73	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	6,25
<i>M. kansasii</i> 235/80	12,5	3,13	1,56	1,56	1,56	>100	>100	25
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3,13	1,56	3,13	1,56	1,56	3,13	6,25	1,56

Tabulka 4: Výsledky testů - antimykobakteriální aktivita (pokračování)

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )							
	JZ-102	JZ-103	JZ-104	JZ-105	JZ-106	JZ-107	PZA	INH
<i>M. avium</i> 80/72	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	12,5
<i>M. avium</i> 152/73	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	3,13
<i>M. kansasii</i> 235/80	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	50
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	>100	>100	>100	>100	50	>100	6,25	1,56

Tabulka 5: Výsledky testů - antimykobakteriální aktivita - RETEST (25 – 0,39  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )			
	JZ-98	JZ-99	JZ-100	INH
<i>M. avium</i> 80/72	>25	>25	>25	6,25
<i>M. avium</i> 152/73	>25	>25	>25	6,25
<i>M. kansasii</i> 235/80	3,13	0,78	1,56	25
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3,13	0,78	0,78	0,39

## 9.2. Antifungální aktivita

Standardy: FLU – flukonazol, AMB – amfotericin B

Tabulka 6: Testované kmeny hub

Testované kmeny (kód, číslo)	
CA1 - <i>Candida albicans</i> ATCC 44859	TA - <i>Trichosporon asahii</i> 1188
CT - <i>Candida tropicalis</i> 156	AF - <i>Aspergillus fumigatus</i> 231
CK2 - <i>Candida krusei</i> E28	AC - <i>Absidia corymbifera</i> 272
CG - <i>Candida glabrata</i> 20/I	TM - <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445

Tabulka 7: Výsledky testů - antifungální aktivita

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC (IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> ) (μmol.l <sup>-1</sup> )							
		JZ-96	JZ-97	JZ-98	JZ-99	JZ-100	JZ-101	FLU	AMB
CA	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	0,25	0,016
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	0,5	0,063
CT	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	0,5	0,063
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>128	0,063
CK	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	16	0,125
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	32	0,125
CG	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	4	0,031
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	16	0,125
TA	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	0,25	1
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	0,5	2
AF	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>128	0,25
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>128	0,125
AC	24h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>128	1
	48h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>128	2
TM	72h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	8	1
	120h	>500	>125	>125	>125	>125	>125	16	1

Tabulka 8: Výsledky testů - antifungální aktivita (pokračování)

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC (IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> ) (μmol.l <sup>-1</sup> )							
		JZ-102	JZ-103	JZ-104	JZ-105	JZ-106	JZ-107	FLU	AMB
CA	24h	— *	>125	>125	>125	—	>125	0,25	0,016
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	0,5	0,063
CT	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	0,5	0,063
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	>128	0,063
CK	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	16	0,125
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	32	0,125
CG	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	4	0,031
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	16	0,125
TA	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	0,25	1
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	0,5	2
AF	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	>128	0,25
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	>128	0,125
AC	24h	—	>125	>125	>125	—	>125	>128	1
	48h	—	>125	>125	>125	—	>125	>128	2
TM	72h	—	>125	>125	>125	—	>125	8	1
	120h	—	>125	>125	>125	—	>125	16	1

\*) Látka JZ-102 a JZ-106 se nepodařilo otestovat, kvůli špatné rozpustnosti v médiu.

Výsledky byly neprůkazné.

### 9.3. Antibakteriální aktivita

Standardy: PEN – penicilin G, CIP – ciprofloxacin HCC, PHE – fenoxymethylpenicilin

Tabulka 9: Testované kmeny bakterií

Testované kmeny (kód, číslo)	
SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08	EC <i>Escherichia coli</i> CCM4517
MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08	KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08
SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08
EF <i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961

Tabulka 10: Výsledky testů – antibakteriální aktivita

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC (IC <sub>95</sub> ) (μmol.l <sup>-1</sup> )									
	JZ-96	JZ-97	JZ-98	JZ-99	JZ-100	JZ-101	PEN	CIP	PHE	
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	0,24	0,98	0,24
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	0,24	0,98	0,24
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	500	250
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	500	500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	31,25	250	62,5
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	250	250
EF	24h	>500	<b>250</b>	<b>125</b>	>500	<b>125</b>	<b>62,5</b>	7,81	0,98	7,81
	48h	>500	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	<b>125</b>	<b>62,5</b>	15,62	0,98	7,81
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	0,06	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	125	0,06	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	0,12	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	0,12	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	3,9	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	7,81	>500

Tabulka 11: Výsledky testů – antibakteriální aktivita (pokračování)

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) MIC (IC <sub>95</sub> ) (μmol.l <sup>-1</sup> )									
	JZ-102	JZ-103	JZ-104	JZ-105	JZ-106	JZ-107	PEN	CIP	PHE	
SA	24h	– *	>125	>125	>250	–	>125	0,24	0,98	0,24
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	0,24	0,98	0,24
MRSA	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	125	500	250
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	125	500	500
SE	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	31,25	250	62,5
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	125	250	250
EF	24h	–	<b>62,5</b>	>125	<b>250</b>	–	>125	7,81	0,98	7,81
	48h	–	<b>125</b>	>125	<b>250</b>	–	>125	15,62	0,98	7,81
EC	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	125	0,06	>500
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	125	0,06	>500
KP	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	250	0,12	>500
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	500	0,12	>500
KP-E	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	>500	>500	>500
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	>500	>500	>500
PA	24h	–	>125	>125	>250	–	>125	>500	3,9	>500
	48h	–	>125	>125	>250	–	>125	>500	7,81	>500

\*) Látka JZ-102 a JZ-106 se nepodařilo otestovat, kvůli špatné rozpustnosti v médiu.

Výsledky byly neprůkazné.

## V. Diskuse

### 10.1. Syntéza

Výchozí látky 5-chlor-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamid (VL1) a 5-chlor-*N*-(2-chlorfenzyl)pyrazin-2-karboxamid (VL2) byly připraveny běžnými metodami dle postupu Servusová [88] a kol. s relativními izolovanými výtěžky 75 % pro VL1, resp. 55 % pro VL2. Totožnost těchto výchozích látek byla ověřena teplotou tání a  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektry, přičemž tyto odpovídaly hodnotám změřeným Zitkem a kol. (nepublikovaná data).

Příprava finálních látek probíhala mechanismem nukleofilní substituce chloru na pyrazinovém jádře primárními alkylaminy. Tato reakce probíhala za mírných podmínek (reflux v ethanolu, t. v. 78 °C) s reakční dobou (výrazná převaha produktu na TLC) přibližně 2 - 3 hodin. Příslušný alifatický amin byl do reakce přidáván v nadbytku minimálně 3 molárních ekvivalentů a větší nadbytek vedl k rychlejšímu průběhu reakce. U nízkovroucích aminů, které lze z reakční směsi snadno odstranit opakovanou destilací za sníženého tlaku (propylamin, t.v. 49 °C; butylamin t.v. 78 °C), se proto osvědčilo použít vyšší nadbytek (6 molárních ekvivalentů). Izolované výtěžky produktů po přečištění pomocí flash-chromatografie se pohybovaly od 31,15 % do 90 %. Finální produkty jsou nové, v literatuře doposud nepopsané látky (kontrola 29. 3. 2013 v Chemical Abstracts).

### 10.2. Analýza

Analytická data připravených látek plně odpovídala předpokládaným strukturám. Vodík amidické -CONH skupiny se v  $^1\text{H}$  NMR spektru jevil jako singlet, který v DMSO vykazoval posun v rozmezí 9,96 až 10,07 ppm, v  $\text{CDCl}_3$  poté v rozmezí 9,39 až 10,06 ppm. Posun vodíku -NH alkylaminoskupiny byl výrazně závislý na rozpouštědle. V DMSO- $d_6$  se nacházel v aromatické oblasti. U látek JZ-96 a JZ-97 přibližně s posunem 7,8 - 7,9 ppm a splýval tak do multipletu s aromatickými vodíky H2' a H6' fenylového jádra. U látek JZ-102 až JZ-104 (s 2-chlorfenzylovým jádrem) se jednalo o triplet o přibližném posunu 8,0 ppm; vzhledem k odlišnému posunu aromatických vodíků díky 2-chlor substituci zde k překryvu nedocházelo. V  $\text{CDCl}_3$  však tento vodík vykazuje posun 5,3 - 5,4 ppm (široký singlet).

Jeden aromatický signál  $^{13}\text{C}$  NMR spekter (těsně nad 129,0 ppm) vykazoval nízkou intenzitu a v některých spektrech se ztrácel. Ve  $^{13}\text{C}$  spektru látky JZ-100 nebyl rozpoznán signál jednoho alifatického uhlíku alkylového řetězce. U delších alkylových řetězců toto může nastat překryvem signálů s velmi podobným posunem.

V hmotnostních spektrech připravených látek byl při ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu dominantní vždy molekulový pík  $[\text{M}+\text{H}]^+$  a byla tak potvrzena molekulová hmotnost připravených látek.

V IČ spektrech (ATR-Ge) byla interpretačně nejvýznamnější valenční vibrace karbonylu amidické skupiny  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , která se u jednotlivých látek nacházela v rozmezí 1671 - 1662  $\text{cm}^{-1}$ . V oblasti přibližně 3350 - 3270  $\text{cm}^{-1}$  se nacházely valenční vibrace vazby N-H, které mohou být přiřazeny amidové skupině -CONH- i sekundární aminoskupině -NH-CH<sub>2</sub>. V oblasti 2970 - 2850  $\text{cm}^{-1}$  byly pozorovatelné valenční vibrace vazeb C-H nasyceného alkylového řetězce.

Hodnoty teplot tání se v sérii 5-(alkylamino)-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidů pohybovaly v rozmezí 123,4-131,3 °C, v sérii 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorfenzyl)pyrazin-2-karboxamidů v rozmezí 182,8-210,9 °C. V první sérii teplota tání s prodlužujícím se alkylovým řetězcem klesala, přičemž u alkyků se sudým počtem uhlíků byly hodnoty teploty tání vyšší. V druhé sérii hodnota teploty tání klesala se zvyšujícím se počtem uhlíků rovnoměrně.

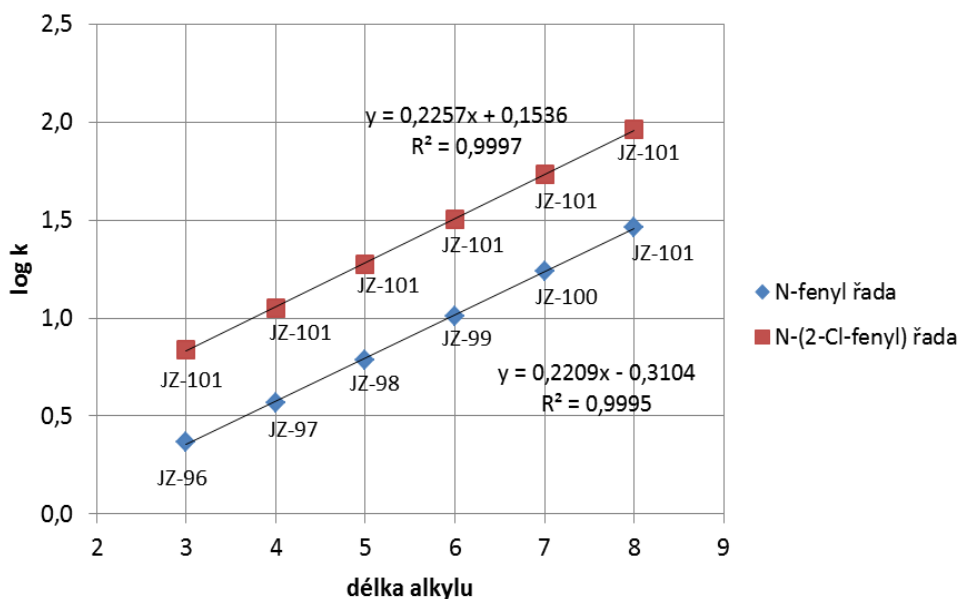
### 10.3. *Lipofilita látek*

Parametr lipofility  $\log P$  (vypočítaný) se v první sérii 5-(alkylamino)-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidů pohybuje v rozmezí 1,63-3,71. U druhé série 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorfenzyl)pyrazin-2-karboxamidů tento údaj činí 2,18-4,27.

Dominantním jevem je přibližně lineární nárůst lipofility v homologních řadách propylamino- až oktylamino-derivátů. Vyjádřeno experimentálně měřeným parametrem  $\log k$ , homologní příspěvek -CH<sub>2</sub>- skupiny byl  $\pi(\log k)_{\text{CH}_2} = 0,223 \pm 0,008$  (průměr  $\pm$  standardní odchylka). Tato malá odchylka svědčí o přesnosti a reprodukovatelnosti měření. Průměrný homologní přírůstek pak přibližně odpovídá i směrnici rovnic lineární regrese (Graf č. 1).

Dle parametru  $\log k$  byly všechny 2-Cl-fenzyl deriváty (JZ-102 až JZ-107) lipofilnější než k nim analogické deriváty bez 2-Cl substituce (JZ-96 až JZ-101). Záměna vodíku za

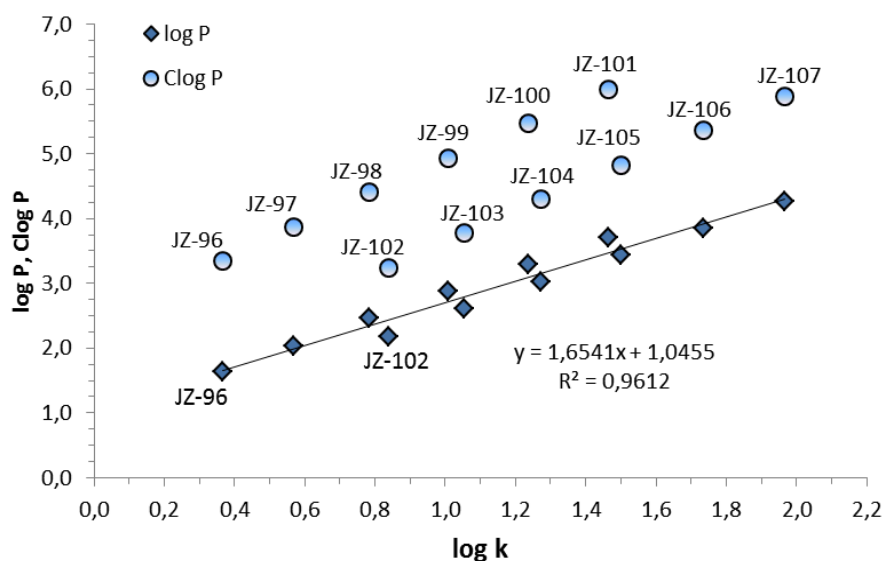
chlor vedle k nárůstu lipofility  $\pi(\log k)_{Cl} = 0,490 \pm 0,007$  (průměr  $\pm$  standardní odchylka).



**Graf č. 1:** Závislost experimentálně měřeného parametru lipofility  $\log k$  na délce alkylového řetězce.

Pro srovnání schopnosti jednotlivých výpočetních algoritmů  $\log P$  a  $\text{Clog } P$  předpovídat lipofilitu připravených látek byly zkonstruovány závislosti předpovídaných parametrů  $\log P$  a  $\text{Clog } P$  na měřeném parametru  $\log k$ , který byl považován za správný a přesný (Graf č. 2). Oba algoritmy správně předpovídaly přírůstky lipofility prodlužováním alkylového řetězce – jak v případě  $\log P$  tak  $\text{Clog } P$  můžeme vždy body pro oddělené série JZ-96 až JZ-101 (bez chloru substituce) a JZ-102 až JZ-107 proložit přímkou lineární regrese. Rozdíl nastává ve výpočtu příspěvku *ortho*-chlor substituce na fenylovém jádře, kde  $\log P$  správně předpovídá nárůst lipofility (srovnej např. JZ-102 vs. JZ-96 na Grafu č. 2), zatímco algoritmus  $\text{Clog } P$  nesprávně předpovídá mírný pokles lipofility. Z tohoto důvodu je  $\log P$  vhodnějším pro výpočet lipofility a existuje zde dobrá korelace s experimentálně měřenou lipofilitou  $\log k$  (lineární regrese s parametry  $R^2 = 0,961$ ,  $n = 12$ ).





Graf č. 2: Korelace předpovídaných parametrů lipofility  $\log P$  a  $C\log P$  na experimentálně stanoveném parametru  $\log k$ .

#### 10.4. Hodnocení biologické aktivity

Výsledky biologických hodnocení ukázaly, že připravené látky jsou **antifungálně a antibakteriálně neúčinné**, vyjma látek JZ-101 a JZ-103, které vykazují pouze nepatrnou účinnost ( $62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) proti kmenu *Enterococcus sp.* J 14365/08 v porovnání se standardem PEN ( $7,81 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Při testování látek JZ-102 až JZ-107 s 2-chlorfenyl substitucí byla kvůli zhoršené rozpustnosti v testovacím médiu dosažena nejvyšší koncentrace pouze  $125 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (standardně je nejvyšší testovaná koncentrace  $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Látky JZ-102 a JZ-106 se v testovacím médiu nepodařilo dostatečně rozpustit.

5-(alkylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy JZ-96 až JZ-101 vykazaly antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* na úrovni  $\text{MIC} = 0,78 - 3,13 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , tedy lepší aktivitu v porovnání s PZA ( $\text{MIC} = 6,25 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Nejúčinnějšími látkami se jevily hexylamino- (JZ-99) a heptylamino- (JZ-100) homology s  $\text{MIC} = 0,78 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (*M. tuberculosis*), nicméně rozdíl  $\text{MIC}$  v celé řadě propyl až oktylamino- homologů činily pouze 2 koncentrace, přičemž jedna koncentrace v dvojkovém ředění je běžnou chybou tohoto skríninkového testu. Přihlédneme-li k výrazně vyšším molárním hmotnostem finálních produktů v porovnání s PZA ( $M_r = 123,11$ ), můžeme konstatovat, že po orientačním přepočtení na molární koncentrace jsou připravené nejúčinnější látky

vůči *M. tuberculosis* až 20x účinnější než PZA, např. MIC (JZ-100) = 2,5 mmol.l<sup>-1</sup>; MIC(PZA) = 51 mmol.l<sup>-1</sup>. Předlohou látkou této série, 5-chlor-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (VL1), dříve vykazala aktivitu MIC = 1,56 – 3,13 µg.ml<sup>-1</sup> (*M. tuberculosis*; Zitko a kol., nepublikovaná data). Záměnou atomu chloru v předlohou struktuře VL1 za alkylamin tedy nedochází ke ztrátě antimykobakteriální aktivity. U látek JZ-96 až JZ-100 byla identifikována i významná aktivita vůči testovanému kmenu *M. kansasii*, které je přirozeně rezistentní vůči PZA.

Ke zcela odlišným výsledkům jsme dospěli v sérii 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidů JZ-102 až JZ-107. Tyto látky byly antimykobakteriálně neúčinné a zavedením alkylamino substituentu do předlohou molekuly 5-chlor-*N*-(2-chlor)fenylpyrazin-2-karboxamidu (VL2), MIC = 0,78 – 3,13 µg.ml<sup>-1</sup> (*M. tuberculosis*; Zitko a kol., nepublikovaná data), došlo ke ztrátě aktivity. Ztráta aktivity může plynout z příliš vysoké lipofility těchto látek, která omezuje jejich rozpustnost a tím i biologickou dostupnost.

Látky typu 5-(alkylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů tedy vykazaly slibnou antimykobakteriální aktivitu a zároveň byly neúčinné vůči testovaným bakteriálním a houbovým patogenům. Tato selektivita účinku naznačuje, že látky nejsou obecně cytotoxické.

## VI. Závěr

Tato rigorózní práce je zaměřena na přípravu nových látek, potenciálně účinných v léčbě TBC. Podařilo se mi připravit celkem 12 látek, jejichž příprava je detailně popsána v příslušné kapitole experimentální části této práce. Nové připravené látky jsou prezentovány v samostatné kapitole.

Byly připraveny tyto deriváty pyrazinamidu:

- 1.) *N*-fenyl-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 2.) 5-(butylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid
- 3.) *N*-fenyl-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 4.) *N*-fenyl-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 5.) *N*-fenyl-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 6.) *N*-fenyl-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 7.) *N*-(2-chlorfenyl)-5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 8.) 5-(butylamino)-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid
- 9.) *N*-(2-chlorfenyl)-5-(pentylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 10.) *N*-(2-chlorfenyl)-5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 11.) *N*-(2-chlorfenyl)-5-(heptylamino)pyrazin-2-karboxamid
- 12.) *N*-(2-chlorfenyl)-5-(oktylamino)pyrazin-2-karboxamid

V teoretické části byly jen stručně shrnuty dostupné informace o tuberkulóze a o její léčbě. Zde jsem se zaměřil zejména na molekulu pyrazinamidu, jejíž deriváty jsou předmětem méj experimentální činnosti. Dále byla v kapitole 2.3. *Potenciální léčiva* představena nová antituberkulotika v preklinických a klinických studiích. V této části jsem aktualizoval svoji sekci *Výzkum a vývoj nových antituberkulotik*, která již byla uvedena v méj diplomové práci. Také jsem zde uvedl některé nové systémy pro transport látek při léčbě tuberkulózy, využitelné především pro terapii inhalací účinných látek. Tato práce je založena na syntéze nových antituberkulotik, proto jsem zde také zmínil některé syntetické postupy týkající se přípravy derivátů pyrazinamidu či podobných molekul.

Všechny látky byly testovány na antimykobakteriální, antifungální i antibakteriální aktivitu. Významný antifungální či antibakteriální účinek u nich prokázán nebyl, některé z nich však vykázaly zajímavou aktivitu antimykobakteriální.

Jsou to zejména látky ze série 5-(alkylamino)-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů. Obzvláště látky JZ-99 a JZ-100 se v tomto směru ukázaly být nejaktivnější a po přepočtení na molární koncentrace jsou vůči *M. tuberculosis* až 20x účinnější než standard PZA. Série 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidů byla antimykobakteriálně neúčinná. Alkylamino- substituce je tedy výhodná u série látek vycházejících z VL1, naopak při substituci VL2 dochází k vymizení antimykobakteriálního účinku. U připravených látek byl také změřen rozsah teploty tání a hmotnostní spektrum, dále bylo vyhodnoceno IR,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum. Analytická data připravených látek odpovídala očekávané struktuře. Pomocí popsaných metod a uvedeného chemického softwaru byly vyhodnoceny jejich parametry lipofility ( $\log k$ ,  $\log P$ ,  $\text{Clog } P$ ).

## VII. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv  
Řešitel: Mgr. Michal Mlčoch  
Školitel: Mgr. Jan Zitko, Ph.D.  
Název rigorózní práce: Alkylaminoderiváty pyrazinamidu jako potenciální antituberkulotika

Tato práce je výsledkem snahy připravit potenciální účinné struktury odvozené od pyrazinamidu (PZA). Její výsledky přispívají k obohacení výzkumu nových antituberkulotik (antiTBC), který již řadu let probíhá na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Výzkumný záměr připravit nová účinná antiTBC je podpořen současnou situací tuberkulózy ve světě, jež je zde podrobně popsána. Přestože počet případů této nebezpečné infekční nemoci ve všech regionech WHO mírně klesá, pořád není šíření nemoci v některých oblastech zcela pod kontrolou. Důvodem je zejména vznik rezistence nových mykobakteriálních kmenů, jež jsou původci závažných, mnohdy těžko léčitelných případů. Připravené látky vycházejí ze struktury molekuly PZA, jež má uplatnění jako jedno z nejdůležitějších dostupných antiTBC první linie. V posledních letech proběhla u této molekuly revize mechanismu účinku. Všechny nové dostupné informace byly proto v této práci uvedeny.

Dále jsou zde předloženy některé nové systémy pro transport antiTBC. Jsou to především soustavy pro inhalační užití v léčbě TBC. Toto podání léčiv je jednou z možností jak zefektivnit léčbu této nemoci, což naznačují i slibné výsledky testů na zvířatech.

V rámci této práce bylo připraveno celkem 12 nových derivátů PZA. Jedná se o sérii 5-(alkylamino)-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů a 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidů. Připravené látky byly charakterizovány teplotou tání, hmotnostními, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR a infračervenými spektry. Látky byly testovány na antimykobakteriální aktivitu (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* a dva kmeny *M. avium*), a doplňkově rovněž proti vybraným bakteriálním a houbovým patogenům. 5-(Alkylamino)-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidy inhibovaly růst *M. tuberculosis* v koncentraci v rozmezí 0,78 – 3,13 μg.ml<sup>-1</sup> a vykázaly tak lepší aktivitu než standard PZA.

## VIII. Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Michal Mlčoch

Supervisor: Mgr. Jan Zitko, Ph.D.

Title of candidate thesis: Alkylamino- derivatives of pyrazinamide as potential antituberculous drugs

This thesis is a result of intention to prepare potential effective derivatives from pyrazinamide (PZA) structure. These results contribute to enrichment of the research of new antituberculars (antiTBC) which has been carried out at the Dpt. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

The aim of the research to produce the new effective antituberculars is supported by the contemporary state of tuberculosis in the world. This state is closely described in this thesis. Despite of decreasing number of new cases in all six WHO regions, spreading of this infectious disease is not under the control. The main reason is a resistance formation of new mycobacterial strains which can cause hardly treatable cases. The prepared substances are PZA derivatives which represent one of the most important first line drugs for tuberculosis treatment. The latest research focused on mechanism of PZA showed new information which was included in this thesis.

Furthermore, some new systems for delivery of antiTBCs are presented here. They involve inhalation systems and just this administration of drugs can make treatment of this disease more effective. It includes inhalation systems, an effective way of drug administration. Promising results were shown during the testing on animals.

As a part of this thesis, 12 new PZA derivatives were prepared. It includes a series of 5-(alkylamino)-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides and 5-(alkylamino)-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamides. The prepared compounds were characterized by melting points, mass spectra,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and infrared spectra. The compounds were evaluated for antimycobacterial activity (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii* and two stems of *M. avium*), and in addition also for activity against selected bacterial and fungal pathogens. 5-(Alkylamino)-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides inhibited the growth of *M. tuberculosis* at concentrations of 0,78 – 3,13  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , which was superior to PZA standard.

## IX. Seznam použité literatury

- [1] ZITKO, J.; JAMPÍLEK, J.; DOBROVOLNÝ, L. et al.; Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012, vol. 22, no. 7, p. 1598-1601. [ISSN 0960-894X]
- [2] ZITKO, J.; DOLEŽAL, M.; SVOBODOVÁ, M. et al.; Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011, vol. 19, no. 4, p. 1471-1476. [ISSN 0968-0896]
- [3] BÁRTŮ, V.; Tuberkulóza - infekční choroba v 21. století. *Medicína pro praxi*. 2008, vol. 5, no. 6, p. 245-248. [ISSN 1214-8687]
- [4] RICHARD ČEŠKA et al.; *Interna*. 1. vyd. Praha/Kroměříž, Triton, 2010, s. 481-486. [ISBN 978-80-7387-423-0]
- [5] MLČOCH, M.; Deriváty pyrazinu jako potenciální antimykobakteriální léčiva II. *Diplomová práce*. 2012.
- [6] BÁRTŮ, V.; Tuberkulóza ve světle 21. století. *Medical tribune*. 2010, roč. 6, č. 4. [ISSN 1214-8911]
- [7] WHO; Global tuberculosis report 2012, 2012, p. 1-90. [ISBN 978-92-4-1564502]
- [8] LAWN, D. S.; NICOL, P. M.; Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiology*. 2011, vol. 6, no. 9, p. 1067-1082. [ISSN 1746-0913]
- [9] SMALL, M. P.; PAI, M.; Tuberculosis diagnosis - Time for a game change. *The New England Journal of Medicine*. 2010, vol. 363, p. 1070-1071. [ISSN 0028-4793]
- [10] WHO; [http://www.who.int/tb/features\\_archive/factsheet\\_xpert.pdf](http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_xpert.pdf). WHO endorsement and recommendations: Tuberculosis diagnostics Xpert MTB/RIF test. [cit. 2013-3-8]
- [11] WHO; [http://who.int/tb/features\\_archive/TBXpert\\_briefing\\_note.pdf](http://who.int/tb/features_archive/TBXpert_briefing_note.pdf). TBXpert Project. [cit. 2013-3-8]

- [12]WHO; Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational „How-to“; practical considerations. 2011, p. 1-36. [ISBN 978-92-4-150156-9]
- [13]SBÍRKA ZÁKONŮ ČESKÉ REPUBLIKY, Částka 110, Vyhláška č. 299, kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem, ve znění pozdějších předpisů, ze dne 25. října 2010, s. 4244-4246. [ISSN 1211-1244]
- [14]ÚZIS ČR; Tuberkulóza a respirační nemoci 2011. [ISSN 1210-8685]
- [15]SBÍRKA ZÁKONŮ ČESKÉ REPUBLIKY, Částka 151, Vyhláška č. 473 o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce ze dne 17. prosince 2008. [ISSN 1211-1244]
- [16]ÚZIS ČR; *Aktuální informace č. 55/2012*, Tuberkulóza v Evropě v roce 2010 na základě výsledků Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. [cit. 2013-3-8].
- [17]ABRAHAM, D. J.; ROTELLA, D. P. *Burger's medicinal chemistry, Drug discovery and development, Antiinfectives*. 7. vyd., New York, J. Wiley & Sons. 2010, s. 713, 755-759. [ISBN 978-0-470-27815-4]
- [18]SAYAH, H.; ZIMHONY, O.; JACOBS, R. W. Jr. et al.; Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, vol. 21, p. 4804-4807. [ISSN 0960-894X]
- [19]SAYAH, H.; PUGLIESE, M. K.; ZIMHONY, O. et al.; Analogs of the antituberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to *M. tuberculosis* Fatty acid synthase I. *Chemistry & Biodiversity*. 2012, vol. 9. [ISSN: 1612-1880]
- [20]ZHANG, Y.; WADE, M. M.; SCORPIO, A. et al.; Mode of action of pyrazinamide: Disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, vol. 52, no. 5, p. 790-795. [ISSN 0305-7453]
- [21]ZHANG, Y.; PERMAR, S.; SUN, Z.; Conditions, that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, vol. 51, no. 1, p. 42-49. [ISSN 0022-2615]



- [22]ZHANG, Y.; SCORPIO, A.; NIKAIDO, H, et al.; Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*. 1999, vol. 181, no. 7, p. 2044-2049. [ISSN 0021-9193]
- [23]GOODSELL. D.; Molecule of the month: Fatty acid synthase, June 2007
- [24]ZIMHONY, O.; COX, S. J.; WELCH, T. J. et al.; Pyrazinamide inhibits the eucariotic-like Fatty acid synthase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*. 2000, vol. 6, no. 9, p. 1043-1047. [ISSN 1078-8956]
- [25]BOEHRINGER, D.; BAN, N.; LEIBUNDGUT. M.; 7.5-Å Cryo-EM Structure of the Mycobacterial Fatty Acid Synthase. *Journal of Molecular Biology*. 2013, vol. 425, no. 5, p. 841-849. [ISSN 0022-2836]
- [26]TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, S. G.; Pathway to synthesis and processing of Mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, vol. 18, no. 1, p. 81-101. [ISSN 0893-8512]
- [27]SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X. et al; Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2011, vol. 333, no. 6049, p. 1630-1632. [ISSN 0036-8075]
- [28]OKUMURA, R.; HIRATA, T.; ONODERA, Y. et al.; Dual-targeting properties of the 3-aminopyrrolidyl quinolones, DC-159a and sitafloxacin, against DNA gyrase and topoisomerase IV: contribution to reducing *in vitro* emergence of quinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, vol. 62, no. 1, p. 98-104. [ISSN 0305-7453]
- [29]VILLEMAGNE, B.; CRAUSTE C.; FLIPO, M. et al; Tuberculosis: The drug development piperine at glance. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, vol. 51, p. 1-16. [ISSN 0223-5234]
- [30]AHMAD, Z.; MINKOWSKI, A.; PELOQUIN, A. Ch. et al.; Activity of the Fluoroquinolone DC-159a in the initial and continuation phases of treatment of murine tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011, vol. 55, no. 4, p. 1781-1783. [ISSN 0066-4804]
- [31]SEKIGUCHI, J-i.; DISRATTHAKIT, A.; MAEDA, S. et al.; Characteristic resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* to DC-159a, a new respiratory quinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, vol. 55, p. 3958-3960. [ISSN 0066-4804]

- [32] BRIGHTY, E. K.; GOOTZ, D. T.; Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. *The Quinolones*. 3. vyd., San Diego, CA., Academic Press. 2000, s. 33-97. [ISBN 978-0-12-059517-4]
- [33] ADHVARYU, M.; VAKHARIA, B.; Drug-resistant tuberculosis: emerging treatment options. *Clinical Pharmacology: advances and applications*. 2011, vol. 3, p. 51-67. [ISSN 1179-1438]
- [34] PUCCI, J. M.; ACKERMAN, M.; THANASSI, A. J. et al.; *In vitro* antituberculosis activities of ACH-702, a novel isothiazoloquinolone, against quinolone-susceptible and quinolone-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010, vol. 54, p. 3478-3480. [ISSN 0066-4804]
- [35] BOGATCHEVA, E.; HANRAHAN, C.; CHEN, P. et al.; Discovery of dipiperidines as new antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2009, vol. 20, no. 1, p. 201-205. [ISSN 0960-894X]
- [36] YADAV, P.; DEOLEKAR, P.; KANASE, V.; MISHRA, S.; Overview of new anti TB drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2012, vol. 3, no. 8, p. 2472-2481. [ISSN 0975-8232]
- [37] BOGATCHEVA, E.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B. et al.; Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, vol. 21, no. 18, p. 5353-5357. [ISSN 0960-894X]
- [38] TREFZER, C.; RENGIFO-GONZALES, M.; HINNER, J. M. et al.; Benzothiazinones: prodrugs that covalently modify the decaprenylphosphoryl- $\beta$ -D-ribose 2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*. 2010, vol. 132, no. 39, p. 13663-13665. [ISSN 0002-7863]
- [39] MAKAROV, V.; MANINA, G.; MIKUSOVA, K. et al.; Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science*. 2009, vol. 324, no. 5928, p. 801-804. [ISSN 0036-8075]
- [40] BAULARD, R. A.; BETTS, C. J.; QUAN, S. et al.; Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000, vol. 275, no. 36, p. 28326-28331. [ISSN 0021-9258]
- [41] WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS.  
<http://www.newtbdrugs.org/project.php?id=92>. CPZEN-45. [cit. 2013-3-17]

- [42] CLINICAL TRIALS.GOV – A service of the U.S. National Institutes of Health.  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01037725?term=AZD5847&rank=1>. AZD5847.  
[cit. 2013-3-10]
- [43] LL-3858. *Tuberculosis*. 2008, vol. 88, no. 2, p. 126. [ISSN 1472-9792]
- [44] MITCHISON, D.; DAVIES, G.; The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012, vol. 16, no. 6, p. 724-732. [ISSN 1027-3719]
- [45] WAYNE, G. L.; SRAMEK, A. H.; Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *M. tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994, vol. 38, no. 9, p. 2054-2058. [ISSN 0066-4804]
- [46] BROOKS, V. J.; FURNEY, K. S.; ORME, M. L. et al.; Metronidazole therapy in mice infected with tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, vol. 43, p. 1285-1288. [ISSN 0066-4804]
- [47] STOVER, K. C.; WARRENER, P.; SHERMAN, R. D. et al.; A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for treatment of tuberculosis. *Nature*. 2000, vol. 405, no. 6789, p. 962-966. [ISSN 0028-0836]
- [48] GINSBERG, M. A.; Emerging drugs for active tuberculosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2008, vol 29., no. 5, p. 552-559. [ISSN 1069-3424]
- [49] NUERMBERGER, E.; TYAGI, S.; TASNEEN, R.; Powerful bactericidal and sterilizing activity of regimen containing PA-824, Moxifloxacin, and Pyrazinamide in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008, vol. 52, no. 4, p. 1522-1524. [ISSN 0066-4804]
- [50] OPC-67683. *Tuberculosis*. 2008, vol. 88, no. 2, p. 132-133. [ISSN 1472-9792]
- [51] PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B. et al.; Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, vol 56, no 5, p. 968-974. [ISSN 0305-7453]
- [52] SQ109. *Tuberculosis*. 2008, vol. 88, no. 2, p. 159-161. [ISSN 1472-9792]
- [53] SCHECTER, F. G.; SCOTT, C.; TRUE, L. et al.; Linezolid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2010, vol. 50, no. 1, p. 49-55. [ISSN 1058-4838]

- [54] CLINICAL TRIALS.GOV – A service of the U.S. National Institutes of Health.  
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00990990?term=PNU-100480&rank=1>.  
PNU-100480. [cit. 2013-3-10]
- [55] AUBRY, A.; PAN, X-S.; FISHER, M. L. et al.; *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase: Interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, vol. 48, p. 1281-1288. [ISSN 0066-4804]
- [56] GOSLING, D. R.; UISO, O. L.; SAM, E. M. et al.; The bactericidal activity of moxifloxacin in patients with pulmonary tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003, vol. 168, no. 11, p. 1342-1345. [ISSN 1073-449X]
- [57] FDA, U.S. Food and Drug Administration, News & Events.  
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm>. [cit. 2013-3-29]
- [58] PANDEY, R.; KHULLER, G. K.; Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, vol. 56, p. 430-435. [ISSN 0305-7453]
- [59] SAIFULLAH, B. et al; Controlled-release approaches towards the chemotherapy of tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine*. 2012, vol. 7, p. 5451-5463. [ISSN 1176-9114]
- [60] O'HARA, P.; HICKEY J. A.; Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: Manufacture and characterization. *Pharmaceutical Research*, 2000, vol. 17, no. 8, p. 955-961. [ISSN 0724-8741]
- [61] PANDEY, R.; KHULLER, K. G.; Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2006, vol. 44, p. 357-366. [ISSN 0019-5189]
- [62] GARCIA-CONTRERAS, L.; HICKEY, A. J.; Pharmacokinetics of aerosolized rifampicin in the guinea pig. *Respiratory Drug Delivery VIII*. 2002, vol 2., p. 699-702. [ISBN 1-93011-451-6]
- [63] GARCIA-CONTRERAS, L.; FIEGEL, J.; TELKO, J. M. et al.; Inhaled large porous particles of capreomycin for treatment of tuberculosis in a guinea pig model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 8, p. 2830-2836. [ISSN 0066-4804]

- [64] MIZOE, T.; OZEKI, T.; OKADA, H.; Application of a four-fluid nozzle spray drier to prepare inhalable rifampicin-containing mannitol microparticles. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*. 2008, vol. 9, no. 3, s. 755-761. [ISSN 1530-9932]
- [65] SHARMA, R.; SAXENA, D.; DWIVEDI, K. A. et al.; Inhalable microparticles containing drug combinations to target alveolar macrophages for treatment of pulmonary tuberculosis. *Pharmaceutical Research*. 2001, vol. 18, no. 10, p. 1405-1410. [ISSN 0724-8741]
- [66] FU, J.; FIEGEL, J.; KRAULAND, E. et al.; New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection. *Biomaterials*. 2002, vol. 23, no. 22, p. 4425-4433. [ISSN 0142-9612]
- [67] SOTO, E.; KIM, S. Y.; LEE, J. et al.; Glucan particle encapsulated rifampicin for targeted delivery to macrophages. *Polymers*. 2010, vol. 2, no. 4, p. 681-689. [ISSN 2073-4360]
- [68] MADIGAN, T. M. et al.; *Brock biology of microorganisms*, 13. vyd., Boston, Pearson, 2012, p. 99. [ISBN 978-0-321-72675-9]
- [69] SARAOGI, K. G.; GUPTA, P.; GUPTA, D. U. et al.; Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, vol. 385, no. 2, p. 143-149. [ISSN 0378-5173]
- [70] COESTER, J. C.; LANGER, K.; van BRIESEN, H. et al.; Gelatin nanoparticles by two step desolvation – a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 2000, vol. 17, no. 2, p. 187-193. [ISSN 0265-2048]
- [71] LAWTON, W. J.; Zein: a history of processing and use. *Cereal Chemistry*. 2002, vol. 79, no. 1, p. 1-18. [ISSN 0009-0352]
- [72] JAHODÁŘ, L.; *Farmakobotanika*. 1. vyd., Praha, Karolinum, 2006, s. 1-264. [ISBN 978-80-246-1791-6]
- [73] MEHTA, K. S.; KAUR, G.; VERMA, A.; Fabrication of plant protein microspheres for encapsulation, stabilization and *in vitro* release of multiple anti-tuberculosis drugs. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011, vol. 375, no. 1–3, p. 219-230. [ISSN 0927-7757]
- [74] SOLOMONS, G; FRYHLE, C; *Organic chemistry*. 10. vyd., New York, J. Wiley & Sons. 2011, p. 779-830. [ISBN 978-0-470-40141-5]

- [75] SVOBODA, J.; *Organická syntéza I.*, 1. vyd., Praha, Vysoká škola chemicko-technologická. 2000, s. 268-280. [ISBN 80-7080-385-1]
- [76] AL-AWARDI, N.; TAYLOR, R.; *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry*. 1986, p. 1585-1588. [ISSN 0368-1769]
- [77] SUGIMOTO, O.; MORI, M.; TANJI, K.; A facile halogenation of some hydroxyheterocycles using triphenylphosphine and *N*-halosuccinimide. *Tetrahedron Letters*. 1999, vol. 40, no. 42, p. 7477-7478. [ISSN 0040-4039]
- [78] SUN, Z.; WANG, H.; WEN, K. et al.; Solvent-free or low-solvent large-scale preparation of chloropyrimidine and analogues. *The Journal of Organic Chemistry*. 2011, vol. 76, no. 10, p. 4149-4153. [ISSN 0022-3263]
- [79] KIJRUNGPHAIBOON, W.; CHANTARASRIWONG, O.; CHAVASIRI, W.; Cl<sub>3</sub>CCN/PPh<sub>3</sub> and CBr<sub>4</sub>/PPh<sub>3</sub>: two efficient reagent systems for the preparation of *N*-heteroaromatic halides. *Tetrahedron Letters*. 2012, vol. 53, no. 6, p. 674-677. [ISSN 0040-4039]
- [80] GABRIEL; *Chemische Berichte*. 1909, vol. 42, p. 657. [ISSN 0009-2940]
- [81] AUTENREITH; *Chemische Berichte*. 1908, vol. 41, p. 157. [ISSN 0009-2940]
- [82] BAY, E.; BAK, A. D.; TIMONY, E. P. et al.; Preparation of aryl chlorides from phenols. *The Journal of Organic Chemistry*. 1990, vol. 55, no 10, p. 3415-3417. [ISSN 0022-3263]
- [83] MATULENKO, A. M.; JIANG, M.; FREY, R. R. et al.; 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-ylamine: structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005, vol. 13, no. 11, p. 3705-3720. [ISSN 0968-0896]
- [84] eCompound.com, DMF catalyzed acid chloride synthesis. [http://ecomound.com/Reaction%20reference/reaction\\_index.htm](http://ecomound.com/Reaction%20reference/reaction_index.htm). [cit. 2013-3-26]
- [85] ERICKSON, E. A.; SPOERRI, E. P.; Syntheses in the pyrazine series. The preparation and properties of the pyrazine halides. *Journal of the American Chemical Society*. 1946, vol. 68, p. 400. [ISSN 0002-7863]

- [86] HENDERSON, J. A.; HADDEN, M.; GUO, C. et al.; 2,3-Diaminopyrazines as Rho kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, vol. 20, no. 3, p. 1137-1140. [ISSN 0960-894X]
- [87] LUNDGREN, J. R. et al.; A highly versatile catalyst system for the cross-coupling of aryl chlorides and amines. *Chemistry: A European Journal*. 2010, vol. 16, no. 6, p. 1983-1991. [ISSN 0947-6539]
- [88] SERVUSOVÁ, B.; EIBINOVÁ, D.; DOLEŽAL, M. et al.; Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*. 2012, vol. 17, no. 12, p. 13183-13198. [ISSN 1420-3049]