

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**STUDIJNÍ PROGRAM FARMACIE**

**STUDIJNÍ OBOR FARMACIE**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV**



## **Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva IV**

Diplomová práce

Vedoucí katedry:

Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Řešitel:

Alena Janoutová

Hradec Králové, duben 2015

## Poděkování

Na těchto řádcích bych velice ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, konzultace a cenné rady, které mi poskytoval po celou dobu při vypracování této práce. Velké díky také patří mým nejbližším, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, informace, data a jejich zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, řádně cituji a uvádím je v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita pro získání jiného kvalifikačního titulu.“

Alena Janoutová

V Hradci Králové 27.4.2015

Tato diplomová práce je výsledkem realizace projektu: „Podpora vzniku, rozvoje a mobility kvalitních výzkumných týmů na Univerzitě Karlově“, číslo projektu CZ.1.07/2.3.00/30,0022, podporovaným Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost (OP VK) a spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Další podpora byla poskytnuta Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 183) a ministerstvem zdravotnictví České republiky IGA NT 13346 (2012).



## OBSAH

1	Seznam použitých zkratk	7
2	Cíl diplomové práce	9
3	Teoretická část	10
3.1	Charakterizace TBC	10
3.2	Diagnostika onemocnění	11
3.3	Epidemiologie v České republice, v Evropě, ve světě	12
3.4	Terapie TBC	15
3.4.1	Antituberkulóza 1. linie a jejich charakterizace	16
3.4.2	Pyrazinamid	18
3.4.3	Alternativní antituberkulóza	20
3.4.4	Vývoj a výzkum potenciálních léčiv v terapii TBC	22
3.4.5	Rezistence	31
4	Experimentální část	32
4.1	Použité chemikálie, přístroje, metody	32
4.2	Postup přípravy výchozích látek	34
4.3	Postup přípravy nových látek	35
4.4	Nově připravené sloučeniny	36
4.5	Výsledky biologického hodnocení	52
4.5.1	Antimykobakteriální aktivita	52
4.5.2	Antibakteriální aktivita	53
4.5.3	Antifungální aktivita	55
4.5.4	Antivirotická aktivita	57
4.5.5	Hodnocení cytotoxicity	59
5	Diskuze	61
6	Závěr	63
7	Abstrakt	65

8	Abstract .....	66
9	Seznam použité literatury.....	68

# 1 Seznam použitých zkratek

AIDS	Acquired immunodeficiency Syndrome, syndrom získaného selhání imunity
AT	antituberkulotika
CMF	klozafimin
CNCTC	Czech National Collection of Type Cultures, Česká národní sbírka typových kultur
CRFK	Crandell-Rees Feline Kidney cells, kočičí ledvinné buňky
CT	computed tomography, výpočetní tomografie
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTS	Directly Observed Treatment short course, režim plně kontrolované léčebné péče
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EMB	ethambutol
FAS I	Fatty Acid Synthase, syntasa mastných kyselin
HEL	Human embrionic lung cell, lidské embryonální plicní buňky
HeLa cells	buňky děložního hrdla Henrietty Lacksové
HIV	Human immunodeficiency Virus, virus lidské nedostatečnosti imunity
IČ, IR	infračervené spektrum
IGRA	Interferon Gamma Release Assay
INH	isoniazid
log <i>P</i>	rozdělovací koeficient v soustavě <i>n</i> -oktanol/voda

MIC	minimální inhibiční koncentrace
MDR	multidrug rezistence, mnohočetná léková rezistence
MR	magnetická rezonance
MRSA	meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney, psí ledvinné buňky
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NYS	Nystatin
OADC	Oleic acid, Dextrose, Katalase – kyselina olejová, dextrosa, katalasa
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
POA	pyrazinkarboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
PZasa	pyrazinamidasa
QR-MDR	multirezistence na chinolony
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RIF	rifampicin
STM	streptomycin
TBC	tuberkulóza
TLC	thin layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace
XDR	extensive drug resistance, extrémní/extenzivní léková rezistence



## 2 Cíl diplomové práce

Cílem mé diplomové práce bylo vypracovat rešerši, která shrnuje základní informace o nemoci tuberkulóze a její terapii. Dále bylo mým úkolem připravit sérii nových derivátů pyrazinamidu, které byly posléze testovány na antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální a antivirotickou aktivitu. Navázala jsem tím na výzkum léčiv s potenciální antituberkulotickou aktivitou, který probíhá na farmaceutické fakultě již několik let. Výsledky jsou podrobně popsány v diskuzi této diplomové práce.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Charakterizace TBC

Nemoc tuberkulóza je způsobena patogenem z rodu *Mycobacterium*, nejčastěji *M. tuberculosis*, případně i dalšími druhy jako jsou *M. bovis*, *M. avium*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. intracellulare* aj. Jedná se o acidorezistentní bakterii, kterou objevil Robert Koch v roce 1882. Člověk se tzv. Kochovým bacilem může nakazit několika způsoby. Nejčastěji je to respirační cestou, v menší míře poraněním, fyzickým kontaktem např. u patologů, infikovanou potravou (mlékem infikovaných krav), jen velmi vzácně přenosem z matky na dítě [1][2][3]. Po AIDS (Syndrom získaného selhání imunity) je tuberkulóza (TBC) druhou nejčastější infekční příčinou úmrtí. Z 95% tito pacienti pocházejí z nejslabších sociálních vrstev [4].

Toto onemocnění z 90 % postihuje plíce, jedná se o plicní formu TBC. Zbylá procenta připadají na formu gastrointestinální, TBC krčních lymfatických uzlin, dále urogenitální či kostní TBC [5].

Tzv. primární TBC představuje nákazu mykobakteriemi již v raném dětském věku, většinou je asymptomatická a dochází ke spontánnímu zhojení zánětlivého místa. U mladistvých a dospělých se můžeme setkat s tzv. postprimární TBC, jakožto reinfekcí dříve získané infekce, či superinfekcí -novým kontaktem s mykobakteriemi. Postihuje převážně imunodeficientní pacienty. Při této formě dochází ke zjizvení plicní tkáně. K přítomným symptomům patří zvýšená teplota, nechutenství, únava, hubnutí, noční pocení, vykašlávání hlenu či krve [4]. Až polovina neléčených pacientů na následky tuberkulózy do 6-10 týdnů umírá [6].

## 3.2 Diagnostika onemocnění

V současnosti se k prokázání TBC využívá několik metod (tuberkulinový kožní test, mikroskopický průkaz mykobakterií ve sputu nebo v dané postižené tkáni, kultivační průkaz, průkaz specifické mykobakteriální DNA (deoxyribonukleová kyselina) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), rentgenový snímek hrudníku, imunologický tuberkulózní test z plné krve). U mimoplicní formy se hojně využívá magnetické rezonance (MR) a výpočetní tomografie (CT) [5]. Pro úplnost je dále potřeba identifikovat mykobakteriální kmen a určit jeho citlivost ke klinicky používaným léčivům. Diagnosticky nejpřínosnější a současně nejspolehlivější metodou je bakteriální průkaz ve sputu či tkáni. Za méně specifickou metodu můžeme považovat rentgenový snímek.

Tuberkulinový kožní test představuje intrakutánní podání dvou tuberkulinových jednotek (čištěný proteinový derivát z mykobakterií) do předloktí. Za pozitivní výsledek považujeme minimální zduření o velikosti pět mm v průměru, nikoliv jen začervenání. Jedná se o imunitní reakci pozdního typu.

Kultivační testy se nejčastěji provádí ze sputa, alternativně i ze žaludeční šťávy, likvoru, moče, stolice. Hodnotíme zde přítomnost živých mykobakterií, výsledek testu je znám za dva až devět týdnů.

Pomocí mikroskopie odebraných materiálů a obarvení dle Ziehl-Neelsena, zjistíme přítomnost acidorezistentních tyčků a výsledek celého testu do dvou hodin [8].

Vedle tuberkulinového testu jsou další nepřímou metodou diagnostiky tzv. IGRA testy (Interferon Gamma Release Assay). Tyto nově zavedené imunologické testy (QuantiFERON TB-Gold test, T-SPOT.TB) jsou vysoce senzitivní a specifické. U obou je detekováno množství gama-interferonu (po stimulaci specifickými mykobakteriálními antigeny) vytvořeného T-lymfocyty, které přišly do kontaktu s *Mycobacterium tuberculosis* (MT). Doba získání výsledku je do 24 hodin. Při onemocnění krve, imunodefektu, imunosupresivní léčbě mohou být i tyto testy méně přesné [7][8].

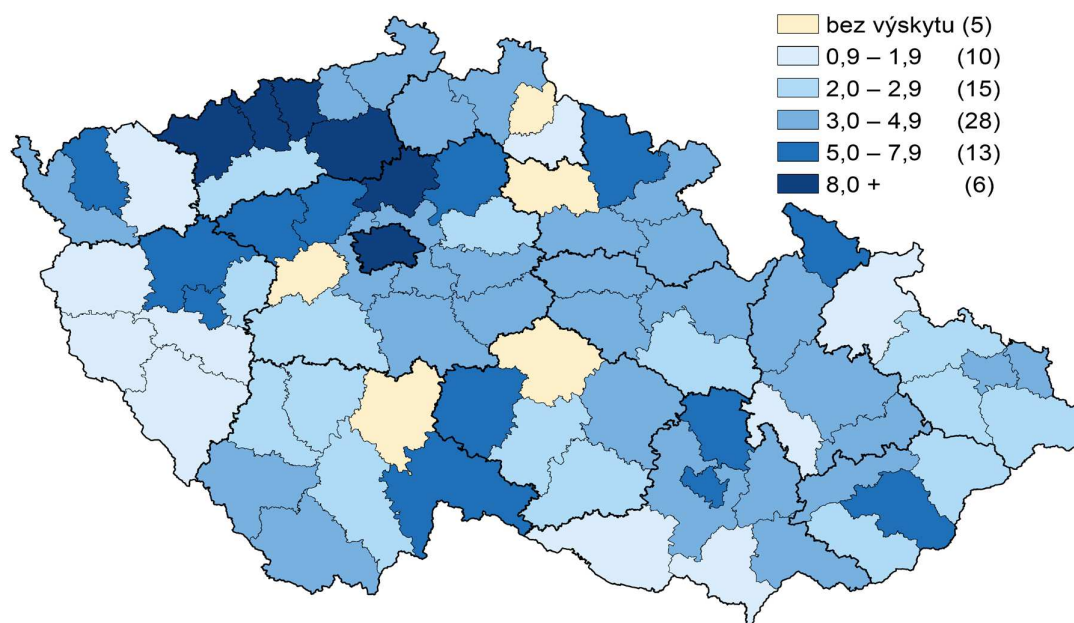
### 3.3 Epidemiologie v České republice, v Evropě, ve světě

Již po dlouhá léta patří tuberkulóza k nejrozšířenějším infekčním onemocněním po celém světě. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) se odhaduje, že je asi jedna třetina veškeré populace nakažena, počet nových případů se ročně odhaduje na šest až devět miliónů, dva až tři milióny nakažených bez včasné pomoci umírá [8].

Česká republika patří celosvětově k zemím s nejnižší incidencí TBC. V roce 2010 bylo u nás 680 nakažených, což představuje 6,5 onemocnění/100000obyvatel, v roce 2011 to bylo již 5,7 onemocnění/100000obyvatel a tato čísla rok od roku klesají [9][10]. Dle posledních dostupných informací o výskytu TBC v ČR zjištěných od Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) bylo v roce 2013 hlášeno celkem 502 případů TBC, tzn. 4,8 onemocnění/100 000 obyvatel, převažují muži (Obr. 1: Počet hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel). V 95 % případů byly postiženy plíce, u zbylé části pacientů šlo o formu mimoplicní.

Největší zastoupení hlášených případů bylo ve věkové kategorii 75 let a více, naproti tomu ve věkové kategorii 0-4 byly hlášeny 3 případy plicní TBC. Mortalita v roce 2013 byla vyčíslena na 44 případů, z toho 42 případů dříve nebylo léčeno žádnými antituberkulotiky (AT) [10]. Velkou část nemocných v ČR zauímají cizinci (Ukrajina, Slovensko, Vietnam) a to až v 16 %. Vedle cizinců jsou rizikovými skupinami zejména bezdomovci, drogově závislí, imunodeficientní a imunosuprimovaní pacienti [9][10].

Počet hlášených onemocnění TBC na 100 000  
obyvatel



Obr. 1: Počet Hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel. Převzato z ÚZIS ČR, Tuberkulóza a respirační nemoci 2013, [10].

Kvůli klesajícímu výskytu TBC v ČR byla v roce 2010 zavedena změna v očkovacím systému, která se opírá o vyhlášku 299/2010 (v souladu se zákonem č. 258/2000 Sb., O ochraně veřejného zdraví). Bylo zrušeno očkování ve 2 a 11 letech a doporučeno očkování dětí pouze vyskytujících se v rizikových skupinách (člen rodiny s aktivní TBC, kontakt s nemocným, pobývání ve státě s vyšším výskytem onemocnění). Dříve očkování probíhalo u dětí do jednoho měsíce stáří, bylo hrazeno zdravotní pojišťovnou. Smyslem zrušení očkování BCG vakcínou byla ochrana imunitního systému dítěte v době, kdy je nejnáchylnější a dán prostor pro jiná očkování (hepatitida B, pneumokokové a hemofilové infekce, černý kašel) [9][11]. Tato situace, ač pro společnost příznivá, s sebou nese několik problémů. Kvůli nízkému výskytu onemocnění se dovozcům, nejen do ČR, nevyplatí dovážet antituberkulotika a očkovací vakcíny, často je jedinou možností individuální dovoz léčiv [9].

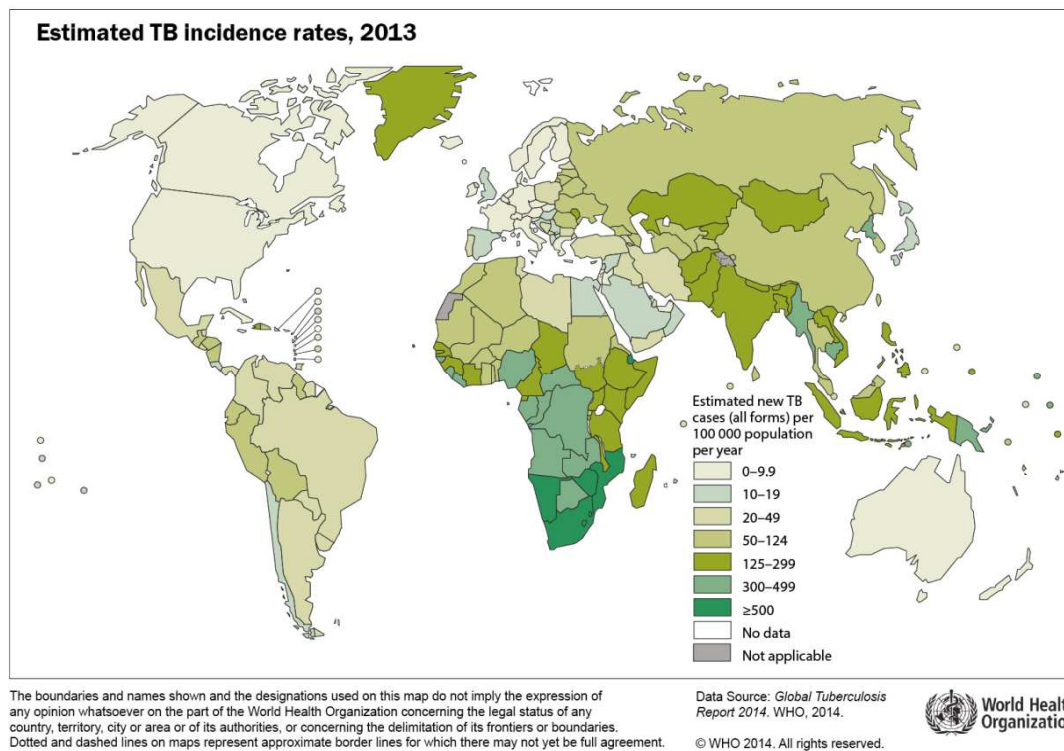
Počet nemocných, v rámci celé Evropy, bohužel vyšší. Dle nejaktuálnějších informací převzatých z ÚZIS bylo v roce 2010 v 52 evropských zemích registrováno 389000 nových případů TBC (43,2 onemocnění/100000 obyvatel). Tato cifra tvoří 4,7 % všech případů

hlášených do WHO. V rámci Evropy se výskyt nemocných zvyšuje od západní k východní části Evropy. Stále převažují muži, a to kvůli většímu zastoupení v rizikových skupinách [12].

Situace ve světě je v porovnání s ČR o poznání horší. Nemoc TBC se vyskytuje ve všech částech světa v různé míře (Obr. 2: Odhadovaný výskyt TBC). Navzdory dostupnosti účinných léčiv zabila tuberkulóza v roce 2013 1,5 milionů lidí [13][14].

V roce 2013 byl největší počet nových případů TBC zjištěn v jihovýchodní Asii a západním Tichomoří, což představuje celosvětově 56% nových případů. Z dalších oblastí, v kterých je situace velmi vážná, můžeme uvést rozvojové africké země, země jižní Ameriky, východní Evropy, řadu balkánských zemí. V některých státech se počet případů snižuje rychle, zatímco v jiných tyto čísla klesají velmi pomalu. V posledním desetiletí klesla prevalence TBC v Kambodži o téměř 50%. Dle údajů uvedených na ÚZIS, šlo v těchto zemích opět z 83 % o plicní formu TBC [14].

#### Odhadovaný výskyt TBC v roce 2013



Obr. 2: Odhadovaný výskyt TBC, 2013, se svolením převzato od WHO, Global Tuberculosis Report 2014, [15].

### 3.4 Terapie TBC

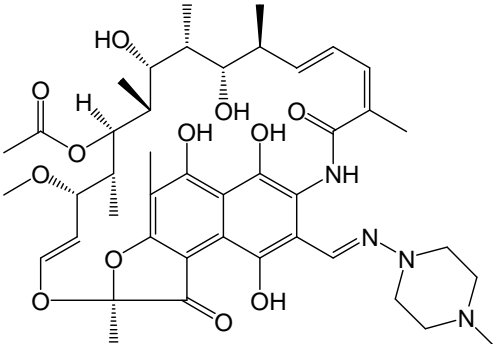
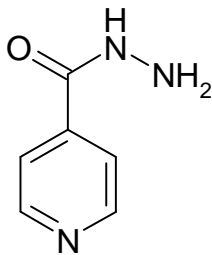
Léčiva užívaná v terapii tohoto onemocnění jsou nazývána antituberkulotika (AT). Z důvodu předcházení vzniku rezistence musí být léčba dlouhodobá, kombinovaná a kontrolovaná [4]. V řadě zemích je s úspěchem využívána a WHO doporučovaná terapeutická strategie DOTS (Directly Observed Treatment Short Course).

Jedná se o 6-8 měsíční léčebný, plně kontrolovaný režim, kdy zdravotník nemocnému podává AT ve dvou fázích. Ač jsou AT 1. linie vysoce účinná, jsou v první fázi léčby (iniciální, intenzivní) podávány ve čtyř až pětikombinaci, a to z důvodu předcházení vzniku rezistence a potenciaci účinku dané kombinace léčiv. Jedná se o kombinaci baktericidního rifampicinu (RIF), isoniazidu (INH), pyrazinamidu (PZA), streptomycinu (STM) a bakteriostatického ethambutolu (ETM), která se podává dva až tři měsíce. V druhé fázi léčby (pokračovací, ambulantní) jsou podávány po dobu půl roku pyrazinamid (PZA) a isoniazid. Cílem této fáze je úplná debacilizace pacienta, který už není pro své okolí infekční. Často jsou nemocní i v první fázi léčby léčeni ambulantně, a to kvůli nízké lůžkové kapacitě zdravotnických zařízení. Terapeutické režimy se také mohou odlišovat dle toho, zda je pacient infikován poprvé nebo zda infekci prodělal již dříve [16].

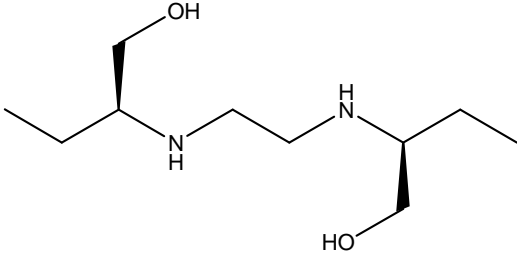
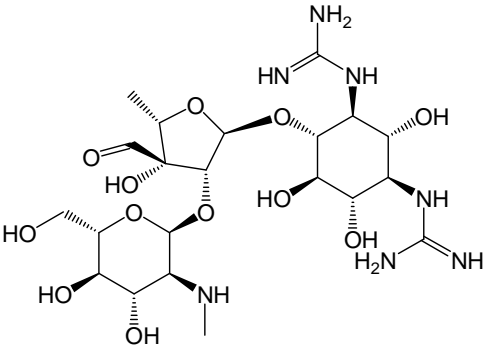
### 3.4.1 Antituberkulotika 1. linie a jejich charakterizace

Vhodné léčivo vybíráme dle několika aspektů, a to vlastnosti léčiva, celkového stavu pacienta, očekávaných nežádoucích účinků, lokalizace infekce aj.

Tabulka 1: Charakteristika antituberkulotik 1. linie. Informace v tabulce získány ze zdrojů [3][4][17][29].

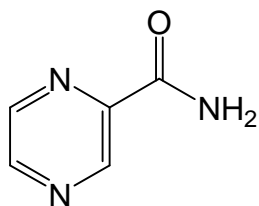
Název a struktura	Charakteristika
<p>Rifampicin</p>  <p>The image shows the chemical structure of Rifampicin, a complex polycyclic molecule with multiple hydroxyl groups, a dimethyl piperazine ring, and a methyl group.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baktericidní</li> <li>- inhibice syntézy bakteriální RNA- inhibice DNA-dependentní RNA-polymerázy</li> <li>- tělní tekutiny barví do oranžova</li> <li>- využívá se i v kombinální léčbě u těžkých stafylokokových infekcí (endokarditida aj.)</li> <li>- významný potenciál k lékovým interakcím (induktor jaterních enzymů)</li> </ul> <p>NÚ – hepatotoxicita, trombocytopenie s purpurou, flu-like syndrom aj.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- další zástupci: rifapentin, rifabutin</li> </ul>
<p>Isoniazid</p>  <p>The image shows the chemical structure of Isoniazid, consisting of a pyridine ring attached to a hydrazide group (-CONHNH2).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baktericidní</li> <li>- inhibice syntézy mykolových kyselin</li> <li>- metabolizuje se na účinnou kyselinu isonikotinovou, dle rychlosti této přeměny se pacienti dělí na rychlé a pomalé metabolizátory, proto je nutné individuálně stanovit a upravit dávkování</li> </ul>



<p>- hydrazid kyseliny nikotinové</p>	<p>NÚ – hepatotoxicita, neurotoxicita, křeče, alergie aj.</p> <p>- vhodná preventivní suplementace pyridoxinem (tvorba komplexu isoniazidu a vit. B6 → rychlé vylučování tohoto komplexu)</p>
<p>Ethambutol</p> 	<p>- bakteriostatický</p> <p>- inhibice syntézy buněčné stěny</p> <p>- rychlý vývoj rezistence v monoterapii</p> <p>NÚ- optická neuritida, barvoslepost, nefrotoxicita aj.</p>
<p>Streptomycin</p> 	<p>- baktericidní</p> <p>- inhibice bakteriální proteosyntézy</p> <p>- aminoglykosidové ATB - neresorbuje se po perorálním podání, nutno podat injekčně</p> <p>- vhodný u těžších forem TBC, meningitid</p> <p>NÚ- irreverzibilní porucha vestibulárního aparátu až hluchota (ototoxicita), nefrotoxicita, neurotoxicita</p>

Záměrně jsem se nezmínila o pyrazinamidu, kterému se budu věnovat detailněji na následujících řádcích.

### 3.4.2 Pyrazinamid



Pyrazinamid (PZA) je jedním z nejzásadnějších AT 1. linie, který významně zkracuje léčbu TBC a je významnou součástí DOTS. Zkracuje trvání léčby z jednoho roka na šest měsíců [21]. Mechanismů jeho působení je zřejmě více, doposud nejsou všechny zcela objasněny.

PZA, v tomto případě jako proléčivo, proniká do buňky pasivní difúzí a intracelulárně se pomocí enzymu pyrazinamidasy (PZasa) hydrolyzuje na aktivní kyselinu pyrazinovou (POA). POA výrazně sníží pH uvnitř buňky, dojde k ovlivnění membránového transportu, ruptuře membrány s fatálními následky pro bakterii. Mutace, chybění, či poškození genu, kterým je kódován enzym PZasa, vede k rezistenci na PZA.

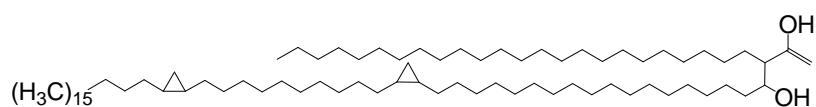
Mykobakterie mají speciální efluxní mechanismus pro POA, kterým je vylučována ven z buňky. Avšak v kyselém prostředí, kdy se POA vyskytuje v neionizované formě, může pronikat do intracelulárního prostoru prostou difúzí. Účinnost je tudíž závislá na pH prostředí, maxima dosahuje při pH 5,5. Jiné hodnoty pH vedou ke snížení účinnosti [18][21].

Dle nedávného zjištění je další významnou vlastností POA inhibice procesu zvaného trans-translace. Jedná se o důležitý, ochranný proces u různých bakterií (*E. coli*, *Streptomyces* aj.), kdy dojde k pozastavení funkce ribozomů při proteosyntéze, zamezí se vzniku a hromadění nefunkčních proteinů, které by mohly poškodit metabolismus bakterie. Předpokládá se, že trans-translace je důležitým procesem pro přežití bakterií za nepříznivých podmínek, nutričním deficitu i působení různých léčiv. Pokud tento ochranný proces neprobíhá, dochází k úhynu bakterií [18][19][20].

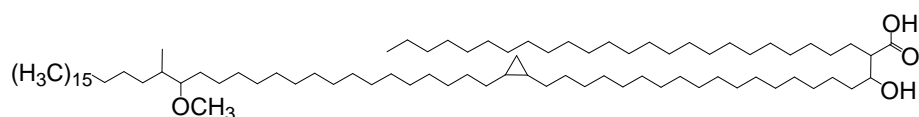
Dalším významným mechanismem účinku PZA je inhibice syntézy mykolových kyselin, které jsou nezastupitelnou součástí buněčných stěn mykobakterií. Jedná se o nasycené lineární mastné kyseliny, které ve svém dlouhém řetězci obsahují cyklopropan a další funkční skupiny. Dle toho se dělí na alfa-, keto- a methoxy- mykolové kyseliny (Obr. 3: Třídy mykolových kyselin). Pyrazinamid, jako analog nikotinamidu, se kompetitivně váže na syntasu mastných kyselin (FAS I, Fatty Acid Syntase) místo NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fostát), který zaručuje správnou funkci enzymu. FAS I je důležitý enzym

zodpovědný za správnou syntézu mykolových kyselin [18]. Kromě pyrazinamidu inhibují tento enzym stejným mechanismem i jeho chlorované analogy. Taktéž dochází ke změnám ve stavbě buněčné stěny a úhynu bakterií [18].

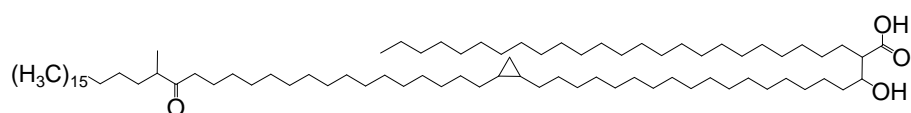
#### $\alpha$ -mykolové kyseliny



#### *cis*-methoxymykolové kyseliny



#### *cis*-ketomykolové kyseliny



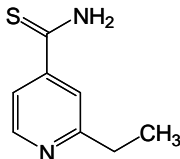
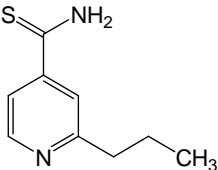
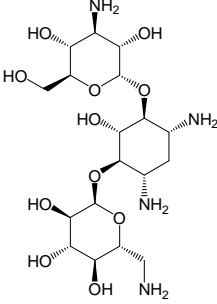
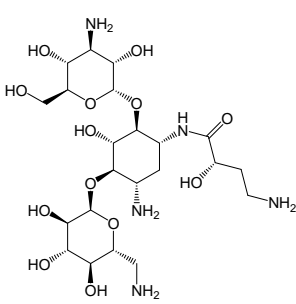
Obr. 3: Třídy mykolových kyselin, vzorce vytvořeny v programu ChemDraw Ultra

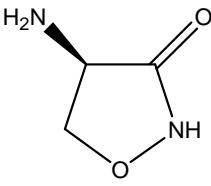
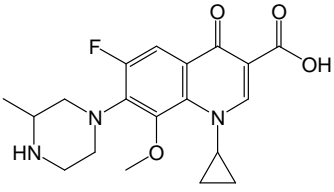
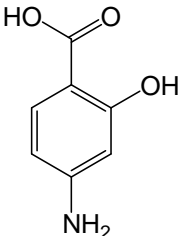
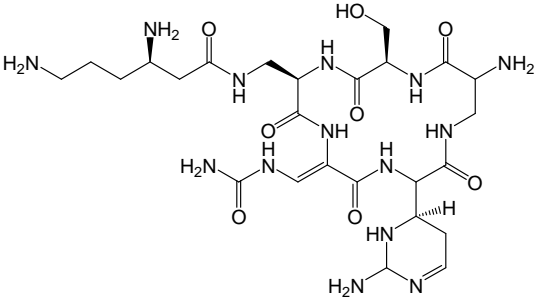
Kombinací výše zmíněných mechanismů účinku PZA dochází k vytvoření fatálních podmínek pro mykobakterie (porušení ochranné buněčné stěny, překyselení buňky, deficit životně důležitých proteinů, aj) [18].

### 3.4.3 Alternativní antituberkulotika

Jako alternativní, rezervní, jsou nazývány léčiva tzv. 2. linie. Přistupuje se k nim z důvodu závažných nežádoucích účinků, rezistence nebo nedostatečného účinku látek 1. linie. Patří sem thioamidy (ethionamid, prothionamid), dále kapreomycin, cykloserin, kyselina aminosalicyllová, aminoglykosidy (kanamycin, amikacin), fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin) aj. Dlouhodobé užívání léků 2. linie je taktéž doprovázeno řadou závažných nežádoucích účinků [17][24]. Ojedinele se u rezistentní formy, u jednostranné plicní, přesně lokalizované TBC provádí léčba chirurgická. Je to metoda doplňující, které předchází anebo následuje několikaměsíční léčba farmakologická [4][23].

Tabulka 2: Přehled antituberkulotik druhé linie, jejich struktury a mechanismy účinku. Informace v tabulce dále získány ze zdrojů [17][24][28].

Název a struktura	Mechanismus účinku
<p data-bbox="188 1126 341 1155">Ethionamid</p> <p data-bbox="539 1126 715 1155">Prothionamid</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="193 1211 373 1368">  </div> <div data-bbox="568 1200 786 1368">  </div> </div>	<p data-bbox="868 1126 1091 1155">- bakteriostatický</p> <p data-bbox="868 1205 1331 1294">- inhibice syntézy mykolových kyselin (strukturně podobné s INH)</p> <p data-bbox="868 1346 1294 1375">- vazba na enoyl-ACP-reduktázu</p> <p data-bbox="868 1429 922 1458">[25]</p>
<p data-bbox="188 1514 405 1543">Aminoglykosidy</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="188 1592 341 1621">Kanamycin</div> <div data-bbox="507 1592 660 1621">Amikacin</div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="188 1671 405 1973">  </div> <div data-bbox="443 1671 740 1973">  </div> </div>	<p data-bbox="868 1514 1043 1543">- baktericidní</p> <p data-bbox="868 1592 1171 1621">- inhibice proteosyntézy</p> <p data-bbox="868 1671 1331 1760">- vazba na 30S podjednotku ribozomu</p>

<p>Cykloserin</p>  <p>4-amino-1,2-oxazolidin-3-on</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baktericidní</li> <li>- inhibice stavby mykobakteriální buněčné stěny</li> <li>- inhibice syntézy peptidoglykanu na základě podobnosti s aminokyselinou <i>D</i>-alaninem)</li> </ul> <p>[26]</p>
<p>Fluorochinolony</p> <p>Gatifloxacin</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baktericidní</li> <li>- inhibice funkce DNA gyrázy</li> <li>- inhibice syntézy a funkce DNA</li> <li>- další zástupci: levofloxacin, ofloxacin</li> </ul>
<p>Kyselina p-aminosalicylová</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bakteriostatický účinek</li> <li>- mechanismus není úplně jasný, zřejmě inhibice syntézy kyseliny listové (inhibice dihydrofolátreduktasy) [27]</li> <li>- v terapii se s výhodou kombinuje se streptomycinem</li> </ul>
<p>Kapreomycin</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- baktericidní</li> <li>- inhibice proteosyntézy</li> <li>- interakce s ribozomálními jednotkami</li> </ul>

### 3.4.4 Vývoj a výzkum potenciálních léčiv v terapii TBC

Z celosvětových výzkumů vyplývá, že léčiva nacházející se v různých fázích klinického zkoušení, zásadní mírou přispívají k několika změnám v léčbě TB. Vyznačují se důležitými vlastnostmi jako je silný a bezpečný účinek, baktericidní vlastnosti, nižší toxicita, zkrácení doby léčby, méně nežádoucích účinků, nižší potenciál k lékovým interakcím, účinnost na rezistentní formy TB, řízené uvolňování léčivé látky či nižší počet přijímaných pilulek [29][30][31].

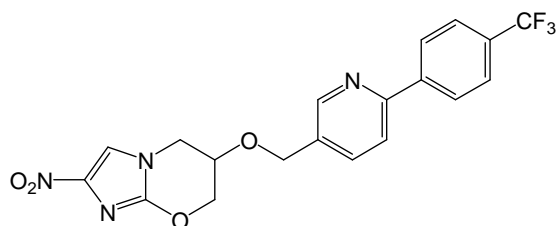
Metody přípravy nových struktur jsou různé. Nejčastěji se vychází z již známých látek, jejichž struktura je modifikovaná, dále zkoumání přírodních látek, výzkum kombinace různých léčiv za účelem zkrácení doby terapie či oddálení vzniku rezistence. Aktuálně se vědci intenzivně věnují tzv. targetingu, cílení. Snaží se najít látky, které by cíleně zasahovaly určitý molekulární cíl (specifický enzym, apod.) a nevratně tak poškodily metabolismus mykobakterií s minimálním poškozením lidských buněk [30].

Od moderních struktur je rovněž požadována co možná nejnížší minimální inhibiční koncentrace (MIC), optimální fyzikálně-chemické vlastnosti a nízká toxicita k lidským buňkám [30].

## ❖ Nitroimidazoly

Ve skupině nitroimidazolů jsou dvě velmi slibné látky, jakožto potenciální léčiva s antituberkulotickým účinkem.

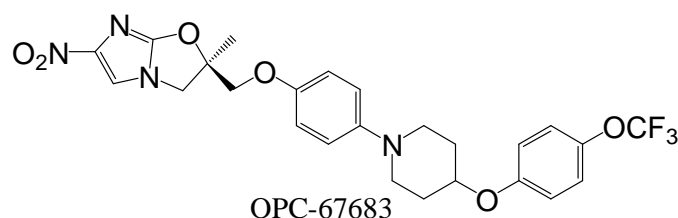
### Pretomanid PA-824



Tato molekula bicyklické struktury je odvozená od metronidazolu. Metabolizuje se na účinnou substanci. Vykazuje silné antimykobakteriální účinky na rezistentní kmeny.

Inhibuje proteozyntézu a syntézu methoxy- a keto-mykolových kyselin nezbytně nutných pro život MT. Dále bylo zjištěno, že při enzymové nitro-redukci dochází k intracelulárnímu uvolnění oxidu dusnatého a fatálnímu zásahu do dýchacího řetězce. Ve studii zveřejněné v roce 2009 (Manjuhatha et al.), je aktivita PA-824 srovnatelná s aktivitou respiračních jedů, jako je kyanid [32]. Účinkuje jak na replikující, tak i na nereplikující. Vykazuje baktericidní účinky (podobné moxifloxacinu a isoniazidu) proti všem MDR i latentním kmenům. V kombinaci s rifampicinem výrazně zkrátila dobu léčby v 1. fázi léčby u multirezistentní TB [29][33]. Nevykazuje zkříženou rezistenci s ostatními AT. Momentálně je zkoušena v 2. fázi klinického hodnocení. [30].

### Delamanid OPC-67683

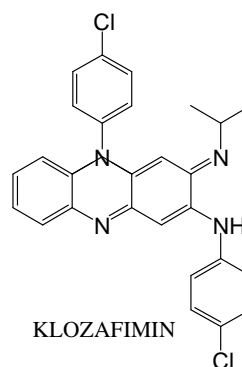
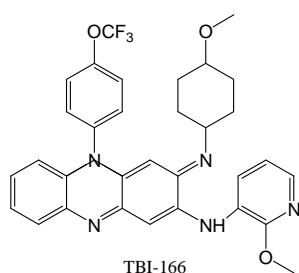


Jedná se o imidazooxazolový derivát, který se vyznačuje výraznou aktivitou proti *Mycobacterium tuberculosis*., až 6-7 krát vyšší

než u běžně používaných AT [30]. Stejně jako Pretomanid je prolečivem, uvolňuje oxid dusný, ve velmi nízkých koncentracích inhibuje syntézu mykolových kyselin pro stavbu buněčné stěny MT [34]. Byl navržen s cílem zvýšit antimykobakteriální aktivitu a snížit toxicitu, která je u předchozí látky výrazná[32]. Svou aktivitou se podobá antituberkulotiku

1. linie rifampicinu, nevykazuje zkříženou rezistenci. Je schválen již v několika zemích (př. Japonsko). Doporučuje se do kombinovaného režimu u multirezistentní TB u dospělých. Tato látka je testována ve 3. fázi klinického hodnocení [35].

### TBI-166



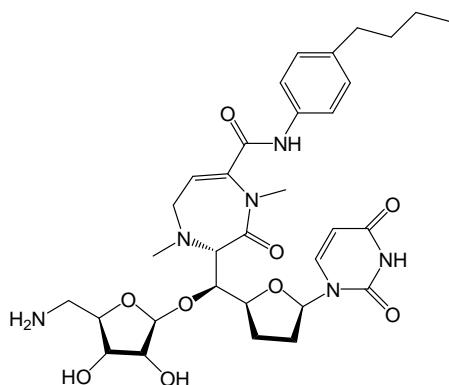
Látka TBI-166 je strukturně odvozena od antimykobakteriálního klofaziminu, který se využíval od roku 1962 k léčbě lepry. Samotný klofazimin je velmi účinný proti rezistentním kmenům mykobakterií a i dnes je součástí terapeutických systémů MDR-TB. Kvůli jeho vysoké lipofilnosti se ve značné míře kumuluje v tukové tkáni, v kůži a mění její barvu, rovněž může způsobit poškození zraku [36]. Toto je hlavní důvod omezení jeho využití ve větší míře. Syntetický analog klofaziminu TBI-166 je méně lipofilní, inhiboval v ekvivalentní dávce růst mykobakterií v ještě větší míře než klofazimin. Nachází se ve fázi preklinického zkoušení [37].



## ❖ Kaprazamyciny

Tato nukleosidová antibiotika vykazují vysokou účinnost proti gram-pozitivním bakteriím, včetně MT.

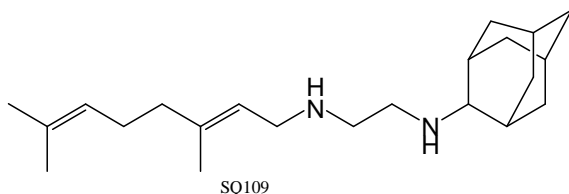
### CPZEN-45



Derivát CPZEN-4 se zdá být kvůli užšímu spektru účinku nejperspektivnějším kandidátem v kombinované léčbě MDR-TB a XDR-TB. Působí inhibičně na syntézu mykolylarabinogalaktanu, podstatnou součást mykobakteriální buněčné stěny. Účinkuje zvláště na pomalu rostoucí mykobakterie (*M. tuberculosis*, *M. Intracellulare*, *M. Avium* *cubsp. paratuberculosis*) [38]. Jeho velkou nevýhodou je špatná rozpustnost ve vodě, tudíž nízká biologická dostupnost po perorálním podání. Parenterální cesta podání byla řešením, ale určitě by tento způsob podání léku snížil compliance pacienta. Ideální volbou se zdá být inhalační podání, což je nyní usilovně zkoumáno. Tato sloučenina se nachází ve fázi preklinického testování [39].

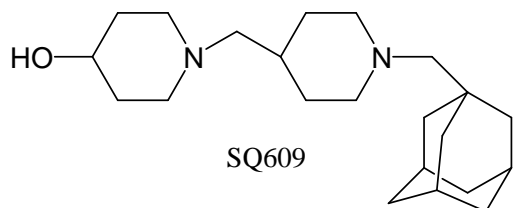
## ❖ Diaminové deriváty

### SQ109



Tento syntetický analog ethambutolu, obsahující ve své struktuře enhyliendiaminový farmakofor, inhibičně zasahuje do syntézy mykobakteriální buněčné stěny, ale odlišným mechanismem než výchozí látka. SQ109. Vykazuje synergický účinek s isoniazidem a rifampicinem a velmi dobře účinkuje na RIF-rezistentní kmeny [32]. Oproti ethambutolu vykazuje až 35 krát vyšší aktivitu, nachází se v 2. fázi klinického zkoušení [30].

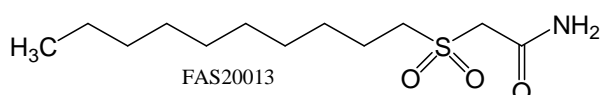
## SQ609



Za antimykobakteriální aktivitu v této skupině léčiv zodpovídá dipiperidinová struktura, která se objevuje i u látek SQ614, SQ615, SQ616. Podstatná je právě velikost heterocyklů a spojující

methylenový můstek. Po obměně jednoho z heterocyklů dochází ke ztrátě antimykobakteriální aktivity [40]. Tyto látky inhibují syntézu buněčné stěny mykobakterií. Jsou vysoce specifické proti MT. Nejslibnější zástupce SQ609 se vyznačuje dobrou rozpustností ve vodě, lze ho podávat perorálně. V kombinaci s INH, RIF a STR je nadějnou součástí kombinované léčby TBC. Tato látka se nachází ve fázi preklinického zkoušení [32][40].

## FAS20013



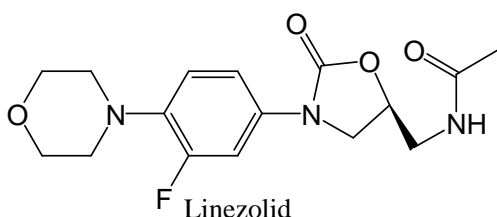
Látka FAS20013 interferuje s energetickým metabolismem buňky, zároveň

inhibuje syntézu mykolových kyselin. Má velký potenciál pro budoucí léčbu TBC. Působí baktericidně na pomalu rostoucí mykobakterie, vykazuje vysokou účinnost k rezistentním kmenům na běžná AT, je biologicky dostupný po perorálním podání, na myších modelech nebyla zjištěna žádná toxicita ani po desetinásobném překročení doporučené dávky [30].

## ❖ Oxazolidindiony

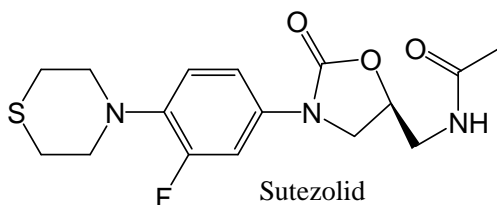
Oxazolidindiony, nová skupina syntetických antibiotik, vykazuje značnou aktivitu také proti rezistentním gram-pozitivním bakteriím, hlavně meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA).

## Linezolid



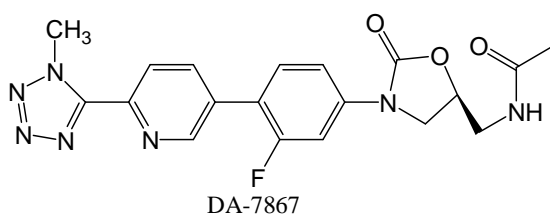
Mechanismus účinku linezolidu spočívá ve vazbě na 50S podjednotku ribozomu, tímto inhibuje proteosyntézu nezbytně nutnou k přežití mykobakterií. Linezolid vykazuje *in vitro* vysokou účinnost proti MT, také je vysoce účinný na infekce způsobených multirezistentními bakteriemi [30]. Délka užívání nesmí překročit 28 dní, z důvodů vyskytujících se nežádoucích účinkům jako periferní a optická neuropatie, hematotoxicita. [32][41][42]. Strukturní obměny této látky vedou ke snížení toxicity a rozšíření spektra účinku. Linezolid se dnes užívá kromě léčby TBC také u infekcí gram-pozitivními bakteriemi kostí, kloubů, endokarditidy, diabetické nohy [43].

## Sutezolid PNU-100480



Sutezolid představuje thiomorfolinový analog linezolidu. Je proléčivem, metabolity (PNU-101603 a PNU-101244) zvyšují účinnost až tři krát oproti linezolidu. Má baktericidní vlastnosti. Jeho aktivita je srovnatelná s isoniazidem a tudíž zaujímá důležité místo pro potenciální léčiva využívané v nových terapeutických režimech. V kombinální léčbě s AT 1. linie zvyšuje v počátcích léčby jejich baktericidní vlastnosti. V klinických studiích nebyly zjištěny žádné neurologické ani hematologické nežádoucí účinky (anémie, trombocytopenie, aj.) ve srovnání s linezolidem [44]. S pyrazinamidem vykazuje synergické působení. Nachází se v 3. fázi klinického testování [32][45].

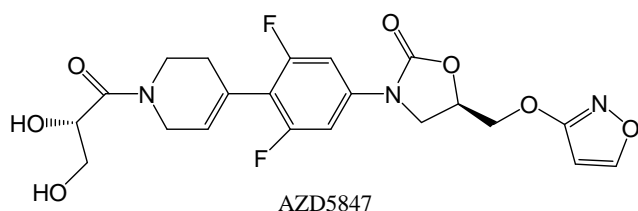
## DA-7867



Nová struktura ve skupině oxazolidindionů, obsahující tetrazol, se také vyznačuje vyšší účinností než u linezolidu [32].

Stejně jako ostatní látky v této skupině působí inhibičně na proces proteosyntézy. Je účinný nejen na MT, ale také na gram-pozitivní bakterie jako MRSA, *Enterococcus*, *Streptococcus pneumonia* [46].

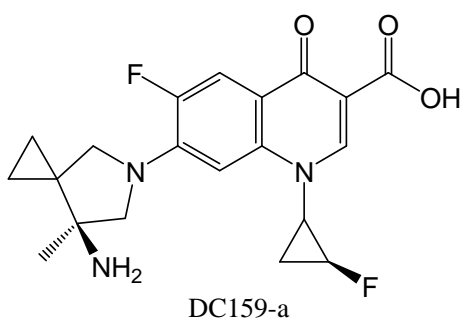
### AZD5847



U této nové struktury byla zaznamenána významná aktivita proti rezistentním kmenům MT, vyšší než u linezolidu. Váže se na 50S podjednotku ribozomu, inhibuje syntézu proteinů. Vykazuje baktericidní účinek proti intra- i extracelulárním, aktivním i pomalu rostoucím mykobakteriím. Vyznačuje se dobrou rozpustností ve vodě, lze ho podávat perorálně [47]. Obměna struktury zajistila minimální nežádoucí účinky oproti linezolidu při zachování vysoké aktivity proti MT. Tato sloučenina vykazuje aditivní účinky s léčivý z 1. linie a podporuje tak potenciální klinické využití AZD5847 v terapii MDR a XDR TBC. Tato látka se nachází ve fázi preklinického testování.[48].

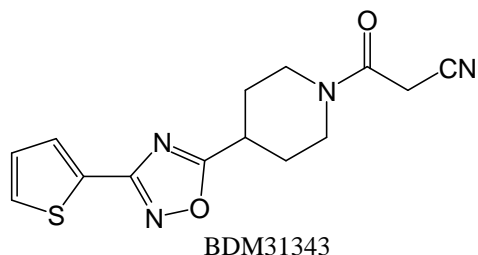
## ❖ Fluorochinolony

### DC-159a



Spolu s moxifloxacinem a gatifloxacinem patří k tzv. nové generaci fluorochinolonů. Mechanismus účinku představuje inhibice DNA-gyrázy, podstatného enzymu při replikaci DNA. DC-159 vykazuje značnou aktivitu proti kmenům rezistentním na ostatní chinolony (QR-MDR-TBC). V dřívější studii bylo dokázáno, že je DC-159a 4-32 krát účinnější než levo-, gati- a moxifloxacin. Další doplňkové preklinické studie v dnešní době stále probíhají[32][49].

## BDM31343

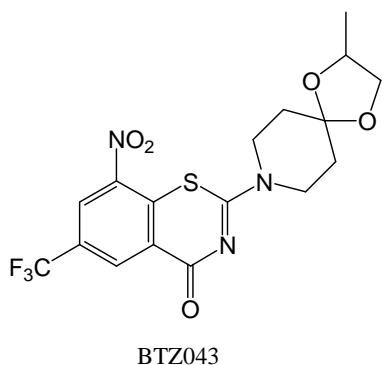


Sloučenina BDM31343 patří do skupiny látek označované jako „posilovače ethionamidu“. Ethionamid (ETH) patří do AT 2. linie, působí proti rezistentním formám MT, avšak jeho nevýhodou je nízký terapeutický index a s tím spojený vysoký výskyt závažných nežádoucích účinků (gastrointestinální, mentální poruchy, hepatitida aj.). ETH je proléčivem, uvnitř bakterie je metabolizován, tím převeden do aktivní formy. Tyto „posilovače“ zasáhnou do metabolické přeměny ETH, zvýší citlivost mykobakterií vůči němu a až 10x sníží jeho dávky potřebné pro antibakteriální aktivitu [50]. BDM31343 spolu s ETH vykazují synergický antibakteriální efekt. Je možné, že se ETH v budoucnu stane AT 1. linie. Nachází se ve fázi preklinického zkoušení [51].

## ❖ Benzothiaziny

Skupina benzothiazinů vykazuje značnou aktivitu proti MT tím, že inhibuje syntézu arabinanu, důležitou součást mykobakteriální buněčné stěny [52].

## BTZ043

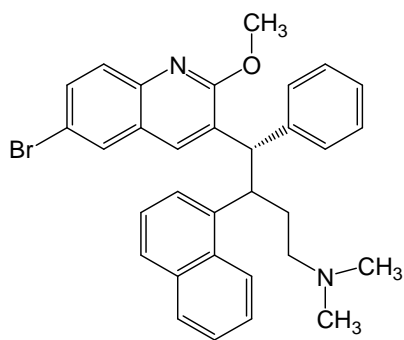


BTZ043 představuje nejaktivnějšího zástupce z řady benzothiazinů (BTZ). Bylo dokázáno, že pro antimykobakteriální účinek je ve struktuře zapotřebí atom síry a jedna nebo dvě nitro skupiny v poloze 1 a 8 [32]. Se sloučeninou TMC207 vykazuje synergistický účinek. Vykazují značnou aktivitu proti MDR a XDR kmenům. I s dalšími AT, dnes již běžně užívanými, vykazují potenciaci účinku proti MT [52].

## ❖ Diarylchinoliny

Ve strukturách těchto sloučenin nalezneme důležitý diarylchinolinový farmakofor, který nalezneme i u antituberkulotika moxifloxacinu. Vykazují značnou účinnost proti MT [53].

### Bedachilin TMC-207



Bedachilin

TMC-207 je velice perspektivní strukturou. Je účinná proti senzitivním i rezistentním kmenům mykobakterií, díky dlouhému biologickému poločasu se podává jednou týdně. S výhodou ho lze podávat s antituberkulotiky 1. linie (RIF, INH, PZA), s kterými vykazuje synergický účinek. Působí inhibičně na membránové vázanou ATPasu a narušuje tak energetický metabolismus mykobakterií [30]. Mechanismus účinku je blokáda ATPsyntasy, důležitého enzymu při tvorbě energie, a znemožnění tak přísunu energie, dojde k rozvratu buňky. Tato látka je již v užívání [53].

### 3.4.5 Rezistence

Stále rozšiřující se rezistence představuje celosvětový problém. Odolnost proti lékům z různých farmakologických skupin je dnes bohužel běžným jevem. Mechanismů vzniku rezistence je známo několik (nesprávně zvolený léčebný režim a dávky AT, přerušovaná či předčasně ukončená terapie při non-compliance pacienta, ale i migrace obyvatelstva či mutace genů u mykobakterií). Všechny tyto aspekty mají za následek změny na molekulární úrovni jako mutaci, selekci, vzniku speciálních enzymů rozkládající dané léčivo (např. u streptomycinu a následné zmnožení rezistentních bakterií) [24]. Dle četnosti léčiv, vůči kterým jsou mykobakterie odolné, rozeznáváme několik typů rezistencí.

Monorezistentní *M. tuberculosis* je rezistentní pouze na jedno léčivo z 1. linie, polyrezistentní je na více antituberkulotik 1. linie, kromě rezistence na INH a RIF, necitlivost právě na INH a RIF je nazývána multirezistencí (MDR-TB). Extenzivní léková rezistence, označovaná XDR-TB, je necitlivost mykobakterií k INH, RIF a dalším třem látkám 2. linie. Výskyt této velmi vážné rezistence byl zaznamenán v roce 2006, jedná se o 4-19% všech MDR-TB. Pro pacienta, který navíc trpí HIV/AIDS, má tato kombinace fatální následky [23].

Každé antituberkulotikum, na které se postupem času vyvinula rezistence, bylo zkoumáno, proč u něj necitlivost mykobakterií nastala. Zjištěné výsledky velkou mírou přispěly ke vzniku molekulárních testů pro rychlou detekci rezistence, které by se podle WHO doporučených léčebných režimů, stejně jako identifikace kmenu mykobakterií, měly provádět před započatím léčby u každého pacienta [23][24].

## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje, metody

Nově připravené látky byly syntetizovány v laboratořích na katedře Farmaceutické chemie a kontrole léčiv s pomocí katedry Anorganické a organické chemie (KAOCH).

Výchozí látky a všechny ostatní chemikálie pocházejí od společnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo).

Pro kontrolu průběhu reakcí a čistoty produktů jsem využívala TLC chromatografii. TLC desky Silica 60 F<sub>254</sub> byly zakoupeny u společnosti Merck (Darmstadt, Německo).

Chromatografie konečných sloučenin byla prováděna na automatizovaném chromatografu CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím kolony naplněné silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Sloučeniny byly detekovány za použití UV-VIS detektoru při vlnové délce při 280 nm.

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla měřena na KAOCH za pomocí doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Pro měření byl použit spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA), při frekvenci 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C nebo Varian Mercury VX-BB 300 při frekvenci 300 MHz pro <sup>1</sup>H a 75 MHz pro <sup>13</sup>C. Spektra byla zaznamenávána v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) nebo deuterovaném chloroformu (CDCl<sub>3</sub>) při laboratorní teplotě.

Infračervená spektra byla zaznamenána na KAOCH pomocí Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) za použití metody ATR (zeslabený vnitřní odraz).

Elementární analýza u nových sloučenin byla provedena analyzátozem CE Instruments EA-1110 CHN (CE Instruments, Wigan, Velká Británie).

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře pomocí bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Velká Británie).

Výtěžky reakcí jsou uvedeny v procentech a uvádí množství chromatograficky čistého produktu po všech čistících krocích.



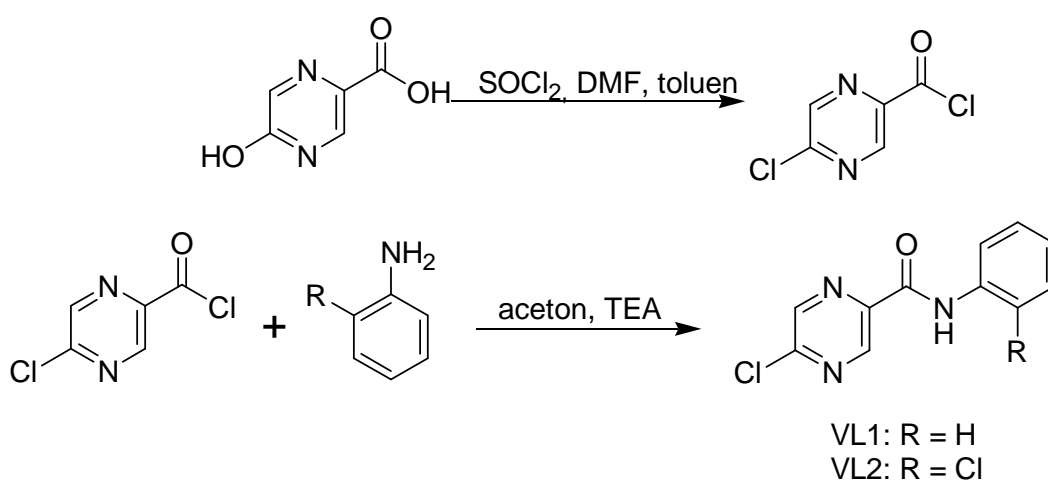
Pro výpočet hodnot  $\log P$  a  $\text{Clog } P$  jsem použila program CS ChemBioDraw Ultra verze 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Chemické vzorce byly rovněž tvořeny v programu CS ChemBioDraw Ultra verze 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

## 4.2 Postup přípravy výchozích látek

Konečné produkty byly syntetizovány z *N*-fenyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidu, ozn. jako VL1, a *N*-(2-chlorfenyl)-5-chlorpyrazin-2-karboxamid, ozn. jako VL2 (Obr. 4: Příprava výchozích látek).

Výchozí látka VL1 a VL2 byly připraveny podle již dříve popsaneho postupu [54]. Totožnost látek byla ověřena pomocí TLC a na základě teploty tání.



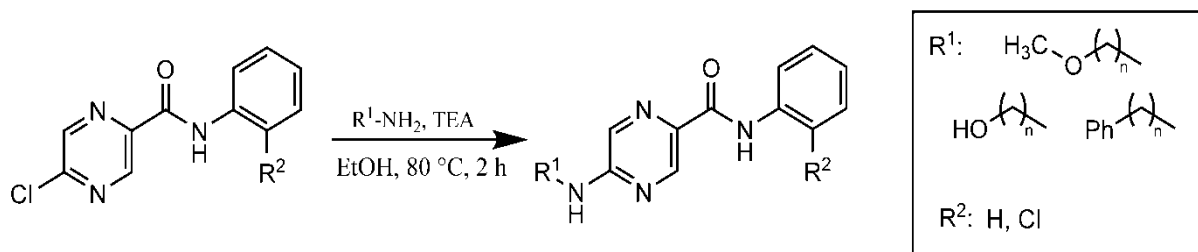
Obr. 4: Příprava výchozích látek

### 4.3 Postup přípravy nových látek

Výchozí látka *N*-fenyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamid (VL1) či *N*-(2-chlorfenyl)-5-chlorpyrazin-2-karboxamid (0,75 mmol, 1 ekv.) byla rozpuštěna v ethanolu, přidán relativní nadbytek příslušného aminu (1,125 mmol, 1,5 ekv.) v přítomnosti 228 mg TEA (2,25 mmol, 3 ekv). V baňce s kulatým dnem byla tato směs míchána a zahřívána pod zpětným chladičem v olejové lázni na teplotu 80 °C přibližně 2 hodiny (Obr. 5: Obecné reakční schéma přípravy konečných produktů). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC chromatografie s mobilní fází hexan-ethylacetát v poměru 1:2. Při detekci dostatečného množství konečného produktu dle TLC a spotřebování výchozí látky byl průběh reakce ukončen.

Dále byla reakční směs naadsorbována na silikagel ve směsi s mořským pískem. Aby byl odstraněn nadbytek TEA, naadsorbovaná směs byla dvakrát odpařena s daným rozpouštědlem (ethanolem). Poté byla provedena flash chromatografie za získáním čistého produktu. Mobilní fází byla směs hexan-ethylacetát, detekční vlnová délka 280 nm, monitorovací vlnová délka 260 nm, rychlost průtoku mobilní fáze 35ml/min. Pomocí TLC byla kontrolována čistota produktu v konkrétních zkumavkách. Obsahy těchto konkrétních zkumavek byly spojeny dohromady, rozpouštědlo odpařeno ve vakuové odparce a konečný produkt vysušen v exsikátoru. V případě nutnosti se látky rekrystalizovaly (směs etanol-voda). Výtěžnost reakcí se pohybovala cca od 43-57 %.

Finální produkty byly charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ spektroskopie, elementární analýzy a bodu tání.



Obr. 5: Obecné reakční schéma přípravy konečných produktů

## 4.4 Nově připravené sloučeniny

### 1) *N*-fenyl-5-[(2-methoxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ1

- **sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 272,30

- **teplota tání:** 153,5-154,8°C

- **log *P*:** 0,65

- **Clog *P*:** 2,28644

- **výtěžek reakce:**

**teoretický:** 204,23 mg

**praktický:** 122 mg, tj. 59,74 %

- **elementární analýza:**

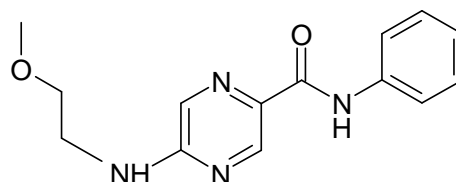
**výpočet:** C 61,75 %, H 5,92 %, N 20,58 %

**nalezeno:** C 61,85 %; H 5,97 %; N 20,71 %

- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (s, 1H, CONH), 8.90 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.80 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.76–7.68 (m, 2H, H2', H6'), 7.41–7.30 (m, 2H, H3', H5'), 7.16–7.06 (m, 1H, H4'), 5.58 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, NH), 3.72–3.53 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 3.39 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.0, 155.6, 143.1, 137.9, 133.2, 130.0, 129.0, 123.9, 119.5, 70.6, 58.8, 40.9

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3308, 3127, 2981, 2888, 2814, 1667, (C=O, CONH), 1592, 1519, 1441, 1310, 1275, 1237, 1197, 1086, 1013, 750, 683



## 2) *N*-fenyl-5-[(3-methoxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ2

- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 286,33

- **teplota tání:** 95,7-96,4 °C

- **log *P*:** 0,75

- **Clog *P*:** 2,64444

- **výtěžek reakce:**

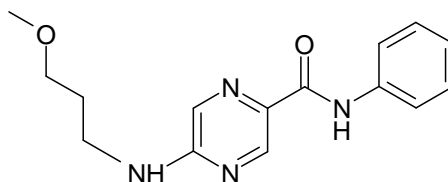
**teoretický:** 214,75 mg

**praktický:** 187 mg, tj. 87,08 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 62,92 %, H 6,34 %, N 19,57 %

**nalezeno:** C 62,94 %, H 6,4%, N 19,51 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (s, 1H, CONH), 8.89 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 7.81–7.67 (m, 3H, H6, H2', H6'), 7.42–7.28 (m, 2H, H3', H5'), 7.17–7.04 (m, 1H, H4'), 5.79 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 3.63–3.43 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 3.36 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.06–1.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 162.1, 155.7, 143.3, 138.0, 132.9, 129.5, 129.0, 123.9, 119.5, 71.5, 58.9, 40.1, 28.8

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3308, 3127, 2981, 2888, 2814, 1667, (C=O, CONH), 1592, 1519, 1441, 1310, 1275, 1237, 1197, 1086, 1013, 750, 683

### 3) *N*-fenyl-5-[(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ3

- **sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 258,28

- **teplota tání:** 167,3-168,8 °C

- **log *P*:** 0,28

- **Clog *P*:** 1,52364

- **výtěžek reakce:**

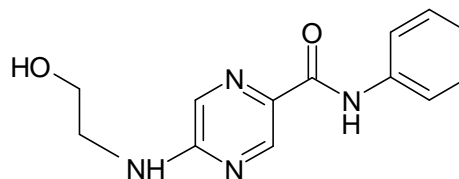
**teoretický:** 193,71 mg

**praktický:** 142 mg, tj. 73,30 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 60,45 %, H 5,46 %, N 21,69 %

**nalezeno:** C 60,51%, H 5,42%, N 21,72 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.08 (s, 1H, CONH), 8.63 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.02 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H6), 7.94–7.79 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.36–7.26 (m, 2H, H3', H5'), 7.10–7.01 (m, 1H, H4'), 4.81 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, OH), 3.56 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 3.43 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.4, 143.0, 138.9, 132.0, 128.8, 123.6, 120.2, 59.5, 43.2

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3326, 3142, 2977, 2945, 2891, 1671, (C=O, CONH), 1593, 1521, 1442, 1311, 1275, 1232, 1194, 1055, 1015, 754, 684

#### 4) *N*-fenyl-5-[(3-hydroxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ4

-sumární vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- molekulová hmotnost: 274,32

- teplota tání: 148,3-159,9 °C

- log *P*: 0,39

- Clog *P*: 1,89244

- výtěžek reakce:

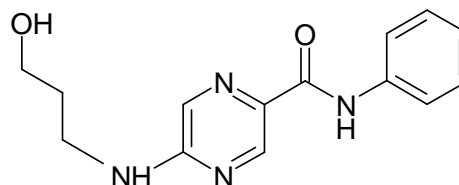
teoretický: 205,74 mg

praktický: 160 mg, tj. 77,77 %

- elementární analýza:

výpočet: C 61,75%, H 5,92%, N 20,58 %

nalezeno: C 61,98 %; H 6,01 %; N 20,69 %



- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.08 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.96 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H6), 7.92–7.75 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.38–7.23 (m, 2H, H3',H5'), 7.12–6.99 (m, 1H, H4'), 4.52 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.56–3.25 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>, NCH<sub>2</sub>), 1.71 (p, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)

- <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.4, 143.2, 139.0, 131.9, 128.8, 123.5, 120.2, 58.6, 37.8, 32.0

- IČ spektrum (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3402, 3320, 3128, 2981, 2947, 2908, 1667, (C=O, CONH), 1593, 1520, 1441, 1310, 1273, 1220, 1196, 1051, 1013, 751, 681

## 5) *N*-fenyl-5-[(4-hydroxybutyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ5

- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 286,33

- **teplota tání:** 143,1-144,4 °C

- **log *P*:** 0,84

- **Clog *P*:** 1,88744

- **výtěžek reakce:**

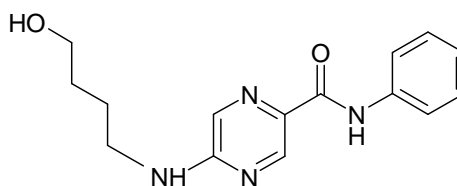
**teoretický:** 214,75 mg

**praktický:** 133 mg, tj. 61,93 %

**elementární analýza:**

**výpočet:** C 62,92 %; H 6,34 %; N 19,57 %

**nalezeno:** C 63,03 %; H 6,41 %; N 19,46 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.07 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.90–7.76 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.38–7.24 (m, 2H, H3', H5'), 7.11–6.97 (m, 1H, H4'), 4.42 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.47–3.28 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 1.70–1.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.3, 143.2, 138.9, 131.9, 128.7, 123.5, 120.1, 60.6, 40.4, 30.1, 25.4

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3336, 2944, 2871, 1674, (C=O, CONH), 1593, 1522, 1442, 1311, 1273, 1223, 1056, 1032, 1014, 754, 691



## 6) *N*-fenyl-5-[(5-hydroxypentyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ6

- **sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 300,36

- **teplota tání:** 137,1-138,8 °C

- **log *P*:** 1,61

- **Clog *P*:** 2,62161

- **výtěžek reakce:**

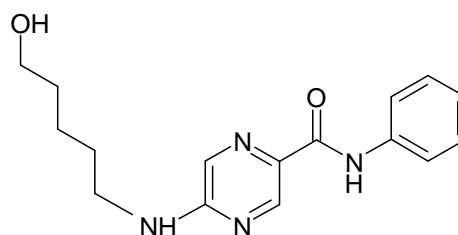
**teoretický:** 225,27 mg

**praktický:** 177 mg, tj. 78,57 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 63,98 %, H 6,71 %, N 18,65 %

**nalezeno:** C 63,91 %, H 6,78 %, N 18,54 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.07 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.90–7.77 (m, 3H, NH, H2', H6'), 7.37–7.26 (m, 2H, H3', H5'), 7.11–7.01 (m, 1H, H4'), 4.36 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.50–3.22 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 1.68–1.24 (m, 6H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.3, 143.2, 138.9, 131.8, 128.8, 123.5, 120.1, 60.8, 32.4, 28.6, 23.3

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3344, 2942, 2860, 1670, (C=O, CONH), 1591, 1519, 1441, 1310, 1270, 1219, 1200, 1060, 1010, 755, 716

## 7) *N*-fenyl-5-[(2-fenylethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ8

- **sumární vzorec:** C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 318,4

- **teplota tání:** 156,6-157,7 °C

- **log *P*:** 2,81

- **Clog *P*:** 4,38444

- **výtěžek reakce:**

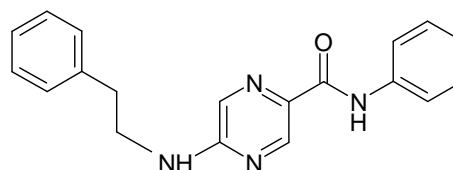
**teoretický:** 238,8 mg

**praktický:** 123 mg, tj. 51,50 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 71,68 %, H 5,7 %, N 17,6 %

**nalezeno:** C 71,51 %, H 5,57 %, N 17,62 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.99 (s, 1H, CONH), 8.57 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.90–7.79 (m, 2H, NH, H6), 7.78–7.70 (m, 2H, H2', H6'), 7.28–7.04 (m, 7H, ArH), 7.01–6.90 (m, 1H, H4'), 3.55–3.43 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.77 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.2, 143.1, 139.5, 138.9, 132.1, 131.3, 128.9, 128.8, 128.5, 126.3, 123.6, 120.2, 42.0, 34.7

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3294, 3135, 2936, 2882, 1663, (C=O, CONH), 1592, 1518, 1441, 1309, 1272, 1221, 1192, 1035, 1011, 752, 715

## 8) *N*-fenyl-5-[(3-fenylpropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-AJ9

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

- **molekulová hmotnost:** 332,4

- **teplota tání:** 133,4-135,1 °C

- **log *P*:** 3,23

- **Clog *P*:** 4,76344

- **výtěžek reakce:**

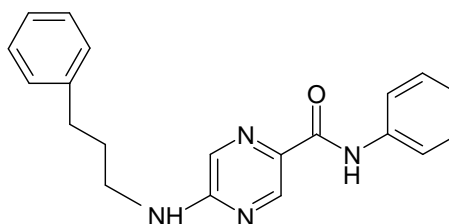
**teoretický:** 249,3 mg

**praktický:** 144 mg, tj. 57,76 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 72,27 %, H 6,06 %, N 16,86 %

**nalezeno:** C 72,31 %, H 6,1 %, N 16,75 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.09 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 7.97 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.91 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H2', H6'), 7.37–7.12 (m, 7H, ArH), 7.10–7.01 (m, 1H, H4'), 3.39–3.29 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 1.86 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.6, 156.3, 143.1, 141.8, 138.9, 132.0, 131.2, 128.8, 128.5, 126.0, 123.5, 120.1, 40.1, 32.7, 30.5

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3310, 3121, 3029, 2933, 2870, 1666, (C=O, CONH), 1589, 1518, 1442, 1309, 1272, 1217, 1190, 1139, 1011, 750, 722, 682

## 9) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-127

- **sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 292,72

- **teplota tání:** 248,7-250,5 °C

- **log *P*:** 0,84

- **Clog *P*:** 1,4182

- **výtěžek reakce:**

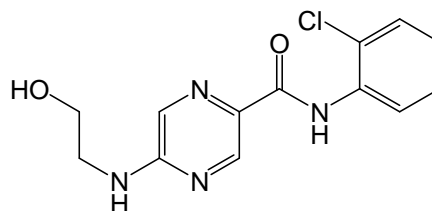
**teoretický:** 219,54 mg

**praktický:** 177 mg, tj. 80,62%

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 53,34 %, H 4,48 %, N 19,14 %

**nalezeno:** C 53,21 %, H 4,59 %, N 18,94 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 9.97 (s, 1H, CONH), 8.64 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H<sub>60</sub>), 8.07–7.96 (m, 2H, NH, H<sub>6</sub>), 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H<sub>30</sub>), 7.42–7.32 (m, 1H, H<sub>50</sub>), 7.18–7.08 (m, 1H, H<sub>40</sub>), 4.82 (t, J = 5.3 Hz, 1H, OH), 3.61–3.52 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.47–3.38 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ 161.9, 156.7, 143.2, 134.8, 132.0, 130.8, 129.5, 128.1, 125.0, 123.2, 121.5, 59.5, 43.3

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3352, 3312, 2967, 2935, 2875, 1657, (C=O, CONH), 1595, 1533, 1445, 1318, 1263, 1233, 1200, 1099, 1060, 1019, 759, 719

## 10) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(3-hydroxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-125

- **sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 306,75

- **teplota tání:** 224,0-224,9 °C

- **log *P*:** 0,95

- **Clog *P*:** 1,787

- **výtěžek reakce:**

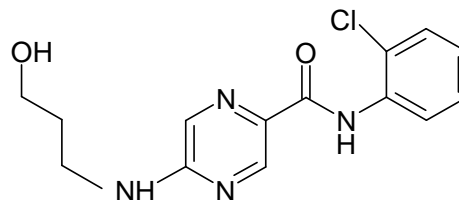
**teoretický:** 230,06 mg

**praktický:** 125,3 mg, tj. 54,46 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 54,82 %, H 4,93 %, N 18,27 %

**nalezeno:** C 54,99 %, H 5,02 %, N 18,35 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 9.87 (s, 1H, CONH), 8.55 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.28 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.93–7.80 (m, 2H, H6, NH), 7.42 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.32–7.21 (m, 1H, H5'), 7.09–6.97 (m, 1H, H4'), 4.42 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.39 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.29 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>), 1.61 (p, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz) δ 162.0, 156.6, 143.3, 134.8, 131.8, 130.7, 129.5, 128.1, 125.0, 123.2, 121.5, 58.6, 37.8, 31.9

- **IČ spektrum** : (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3303, 2948, 2864, 1654, (C=O, CONH), 1598, 1531, 1441, 1315, 1268, 1240, 1191, 1093, 1059, 1009, 752, 692

## 11) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(4-hydroxybutyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-126

- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 320,78

- **teplota tání:** 211,2-212,2 °C

- **log *P*:** 1,40

- **Clog *P*:** 1,782

- **výtěžek reakce:**

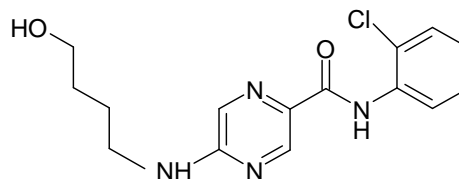
**teoretický:** 240,59 mg

**praktický:** 102,3 mg, tj. 42,52 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 56,17 %, H 5,34 %, N 17,47 %

**nalezeno:** C 56,06 %, H 5,25 %, N 17,68 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$  9.97 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H3), 8.38 (dd, *J* = 8.2, 1.5 Hz, 1H, H6'), 8.00 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.94 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H6), 7.53 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.43–7.31 (m, 1H, H5'), 7.19–7.07 (m, 1H, H4'), 4.42 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.47–3.28 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 1.67–1.40 (m, 4H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz)  $\delta$  162.0, 156.6, 143.3, 134.8, 130.7, 129.5, 128.1, 125.0, 123.2, 121.5, 60.6, 30.1, 25.4

- **IC spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3281, 2945, 2870, 1659, (C=O, CONH), 1598, 1526, 1446, 1315, 1276, 1222, 1195, 1074, 1015, 756, 691

## 12) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(5-hydroxypentyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-128

- **sumární vzorec:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 334,8

- **teplota tání:** 204,0-205,3°C

- **log *P*:** 1,82

- **Clog *P*:** 2,311

- **výtěžek reakce:**

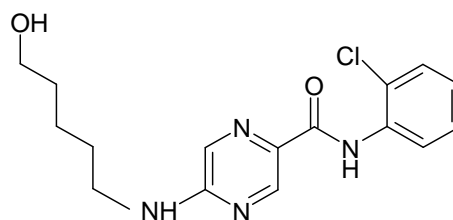
**teoretický:** 251,1 mg

**praktický:** 112,4 mg, tj. 44,76 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 57,4 %, H 5,72 %, N 16,73 %

**nalezeno:** C 57,45 %, H 5,76 %, N 16,85 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 9.96 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H3), 8.39 (dd, *J* = 8.4, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.93 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.52 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, H3'), 7.43–7.29 (m, 1H, H5'), 7.20–7.06 (m, 1H, H4'), 4.36 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.48–3.22 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 1.67–1.24 (m, 6H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz) δ 162.0, 156.6, 143.3, 134.8, 131.8, 130.7, 129.5, 128.1, 125.0, 123.2, 121.5, 60.8, 32.4, 28.6, 23.3

- **IC spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3317, 2943, 2861, 1665, (C=O, CONH), 1595, 1525, 1444, 1314, 1273, 1239, 1219, 1201, 1060, 1010, 754, 690

### 13) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(2-metoxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-131

- **sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 306,75

- **teplota tání:** 216,6-217,1 °C

- **log *P*:** 1,20

- **Clog *P*:** 2,181

- **výtěžek reakce:**

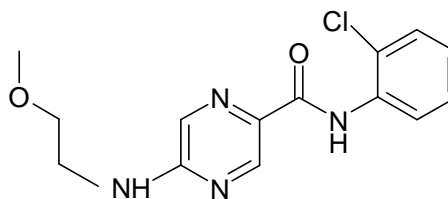
**Teoretický:** 230,06 mg

**Praktický:** 167,5 mg, tj. 72,81 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 54,82 %, H 4,93 %, N 18,27 %

**nalezeno:** C 54,85 %, H 4,88 %, N 18,36 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.98 (s, 1H, CONH), 8.66 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.38 (dd, *J* = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 8.06 (br s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.55–7.51 (m, 1H, 3'), 7.40–7.35 (m, 1H, 5'), 7.17–7.12 (m, 1H, 4'), 3.59–3.46 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 3.32 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.3, 157.0, 143.4, 135.2, 131.9, 131.7, 129.7, 128.3, 125.3, 123.6, 122.0, 70.8, 58.5, 58.4

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3359, 3287, 2937, 2885, 2809, 1665, (C=O, CONH), 1596, 1526, 1446, 1314, 1281, 1236, 1196, 1121, 1085, 1012, 752, 689



## 14) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(3-metoxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-132

- **sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

- **molekulová hmotnost:** 320,78

- **teplota tání:** 171,1-172,6 °C

- **log *P*:** 1,31

- **Clog *P*:** 2,539

- **výtěžek reakce:**

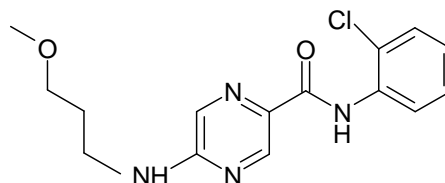
**teoretický:** 240,59 mg

**praktický:** 143,6 mg, tj. 59,69 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 56,17 %, H 5,34 %, N 17,47 %

**nalezeno:** C 56,26 %; H 5,22 %; N 17,63 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 10.07 (s, 1H, CONH), 8.89 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.62 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.81 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.39 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H, H3'), 7.35–7.26 (m, 1H, H5'), 7.08–6.98 (m, 1H, H4'), 5.80 (br s, 1H, NH), 3.62–3.49 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.99–1.87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ 162.2, 155.7, 143.4, 134.9, 132.9, 129.8, 129.0, 127.6, 124.1, 123.1, 120.9, 71.5, 58.9, 40.2, 28.8

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3320, 2986, 2931, 2878, 2809, 1659, (C=O, CONH), 1596, 1524, 1445, 1315, 1273, 1220, 1196, 1120, 1012, 754, 689

## 15) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(2-fenylethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-129

- **sumární vzorec:** C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 352,82

- **teplota tání:** 190,5-191,9 °C

- **log *P*:** 3,37

- **Clog *P*:** 4,279

- **výtěžek reakce:**

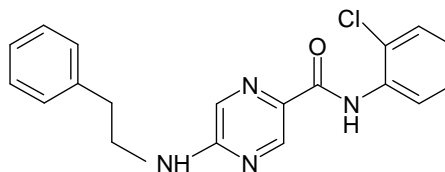
teoretický: 264,62 mg

praktický: 120,0 mg, tj. 45,35 %

- **elementární analýza:**

výpočet: C 64,68 %; H 4,86 %; N 15,88 %

nalezeno: C 64,56 %; H 4,76 %; N 16,1 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 50 °C) δ 10.04 (s, 1H, CONH), 8.92 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3), 8.62 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.78 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.40 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.37–7.19 (m, 6H, ArH), 7.08–7.00 (m, 1H, H4'), 5.14 (br s, 1H, NH), 3.76 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.97 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, 50 °C) δ 162.1, 155.8, 143.5, 138.4, 135.1, 133.7, 129.6, 129.1, 128.8, 128.8, 127.7, 126.8, 124.2, 123.3, 121.2, 42.7, 35.4

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3329, 3060, 3030, 2879, 1664, (C=O, CONH), 1597, 1527, 1443, 1315, 1275, 1222, 1200, 1091, 1011, 756, 697

## 16) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(fenylpropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

Označení: JZ-130

- **sumární vzorec:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O

- **molekulová hmotnost:** 366,85

- **teplota tání:** 179,8-181,1 °C

-**log *P*:** 3,79

-**Clog *P*:** 4,658

- **výtěžek reakce:**

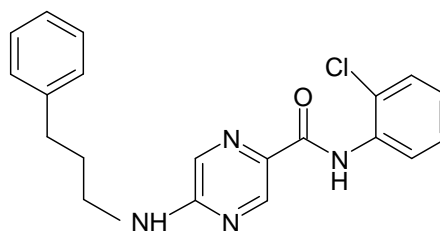
**teoretický:** 275,14 mg

**praktický:** 136,3 mg, tj. 49,54 %

- **elementární analýza:**

**výpočet:** C 65,48 %, H 5,22 %, N 15,27 %

**nalezeno:** C 65,67 %, H 5,3 %, N 15,04 %



- **<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 50 °C) δ 10.04 (s, 1H, CONH), 8.91 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.62 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.75 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.40 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H, H3'), 7.36–7.15 (m, 6H, ArH), 7.09–6.99 (m, 1H, H4'), 5.11 (s, 1H, NH), 3.50 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, PhCH<sub>2</sub>), 2.02 (p, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)

- **<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz, 50 °C) δ 162.1, 155.9, 143.5, 141.1, 135.1, 133.6, 129.3, 129.1, 128.6, 128.3, 127.7, 126.2, 124.2, 123.3, 121.2, 41.3, 33.3, 30.8

- **IČ spektrum** (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3342, 3294, 3030, 2945, 1656, (C=O, CONH), 1597, 1519, 1443, 1317, 1276, 1229, 1190, 1009, 755, 965

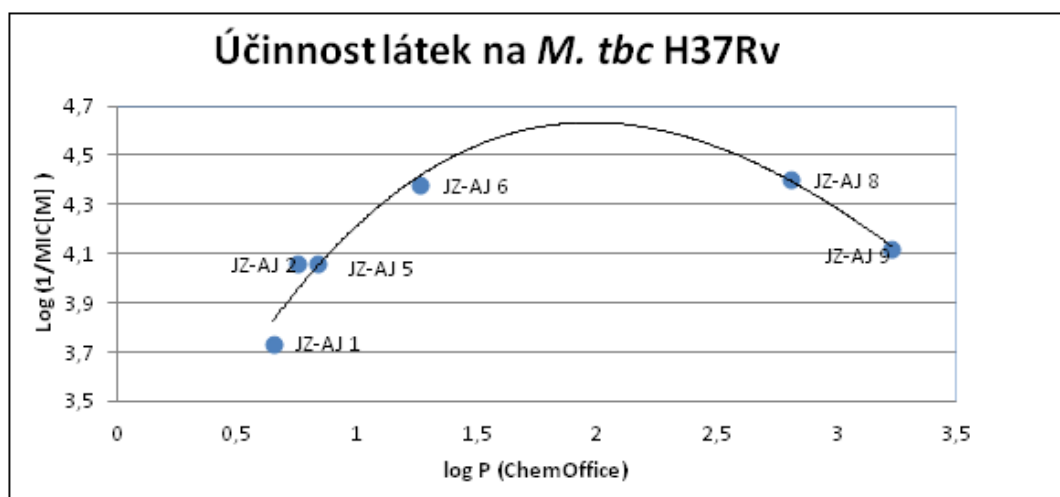
## 4.5 Výsledky biologického hodnocení

### 4.5.1 Antimykobakteriální aktivita

Všechny výše zmíněné látky byly testovány *in vitro* proti *M. tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium kansasii* 235/80 a *Mycobacterium avium* 80/72. Kmeny bakterií byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Praha.

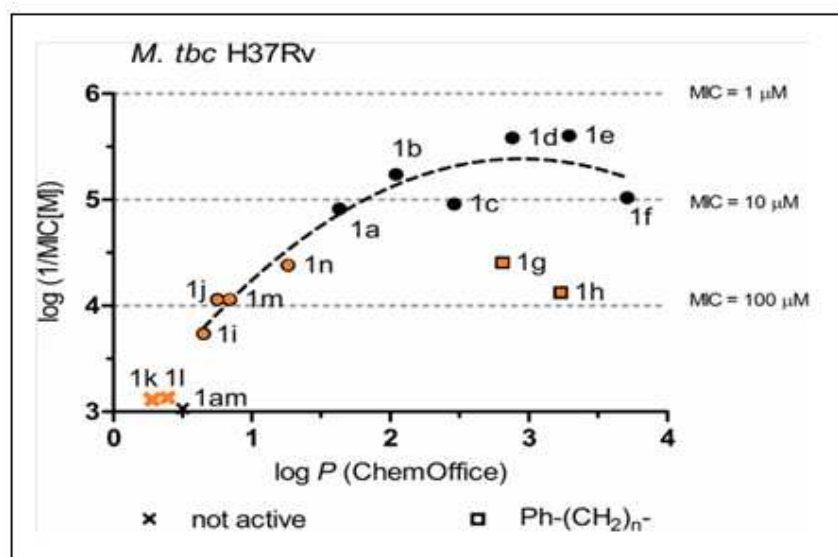
Růstové médium Middlebrook 7H9 bylo obohaceno o doplněk OADC (kyselina olejová, dextrosa, katalasa), oba zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, pH kultivačního média bylo 6,6. Jako pozitivní kontroly byly použity pyrazinamid (MIC 6,25 µg/ml) a isoniazid (MIC 0,2-0,39 µg/ml), negativní kontrola byla složená z živné půdy a dimethylsulfoxidu. Zkoušené látky byly rozpuštěny v DMSO a dvojkovým ředěním naředěny tak, aby finální koncentrace testované sloučeniny v jamkách mikrotitrační destičky byly 100 – 50 - 12,5 - 6,25 - 3,13 - 1,56 µg/ml. Po pěti dnech inkubace byly pomocí přídatku Alamar Blue odečítány výsledky. Minimální inhibiční koncentrace (MIC µg/ml) představovala nejnižší koncentraci látky, která zabránila změně barvy z modré na růžovou.

Mírná účinnost byla prokázána u látek JZ-AJ 1, JZ-AJ 2, JZ-AJ 5, JZ-AJ 6, JZ-AJ 8, JZ-AJ 9, a to na *M. tbc* H37Rv (Graf 1: Účinnost daných látek na *M. tbc* H37Rv). Výsledky jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 10: Souhrnné výsledky testování).



Graf 1: Účinnost daných látek na *M. tbc* H37Rv v závislosti na log *P*

Na následujícím grafu můžeme vidět srovnání mnoha připravených látek (barevně označené), s látkami obsahujícími v postranním řetězci na pyrazinovém jádře pouze alkylaminosubstituenty. Nejvyšší účinnosti dosahují látky s hexylamino- (**1d**) a heptylamino- (**1e**) substituentem.



Graf 2: Srovnání účinnosti na *M. tuberculosis* H37Rv s látkami s alkylaminosubstituenty [56]

Podrobněji jsou látky popsány v níže uvedené tabulce (Tabulka 10: Souhrnné výsledky testování). Látka 1k odpovídá JZ-AJ3, 1l = JZ-AJ4, 1i = JZ-AJ1, 1j = JZ-AJ2, 1m = JZ-AJ5, 1n = JZ-AJ6, 1g = JZ-AJ8, 1h = JZ-AJ9.

#### 4.5.2 Antibakteriální aktivita

Testování na antibakteriální aktivitu probíhalo na Katedře biologie a lékařských věd (Farmaceutická fakulta, Hradec Králové).

Testované kmeny byly kultivovány při teplotě 35 °C, při pH 7,4, na Mueller-Hinton agaru (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI). Testování probíhalo mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách (200 μl media + 10 μl suspenze inokula).

Inkubace probíhala 24 a 48 hodin, staticky, ve tmě, v humidní atmosféře. Před zkouškou byly bakterie suspendovány ve sterilním 0,85% roztoku chloridu sodného. Buněčná hustota inokula byla upravena, čímž se získala suspenze hustoty ekvivalentní

0,5 McFarlandovy stupnice ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a ředěny dvojkovou řadou. Kontrolou bylo samotné médium s DMSO. Odečítání bylo prováděno vizuálně. Minimální inhibiční koncentrace je zde uvedena jako 95% inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s kontrolním médiem.

Látky nevykazovaly žádnou aktivitu v testovaných koncentracích.

Tabulka 3: Testované kmeny bakterií

Testované kmeny (kód/číslo)	
1. <b>SA</b> <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08	5. <b>EC</b> <i>Escherichia coli</i> CCM4517
2. <b>MRSA</b> <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08	6. <b>KP</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08
3. <b>SE</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	7. <b>KP-E</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08
4. <b>EF</b> <i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	8. <b>PA</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961

Tabulka 4: Výsledky testování na antibakteriální aktivitu

Kmen (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC <sub>95</sub> ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )							
		JZ-AJ1	JZ-AJ2	JZ-AJ3	JZ-AJ4	JZ-AJ5	JZ-AJ6	JZ-AJ8	JZ-AJ9
<b>SA</b>	24h	>500	>500	>500	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500
<b>MRSA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>SE</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>EF</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	<b>250</b>	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>EC</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>KP</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>KP-E</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
<b>PA</b>	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 5: Výsledky testování na antibakteriální aktivitu (pokračování)

Kmen (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC <sub>95</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )							
		JZ-125	JZ-126	JZ-127	JZ-128	JZ-129	JZ-130	JZ-131	JZ-132
SA	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
MRSA	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
SE	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
EF	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
EC	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
KP	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
KP-E	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
PA	72h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500
	120h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>125	>500

### 4.5.3 Antifungální aktivita

Připravené sloučeniny byly testovány na Katedře biologie a lékařských věd (Farmaceutická fakulta, Hradec Králové) za použití mikrodilučního bujónového testu.

Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Inkubace kmenů probíhala v médiu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) s glutaminem, ve tmavém, vlhkém prostředí při teplotě 35 °C po dobu 24 a 48 hodin dle typu kmene. U *Trichophyton mentagrophytes* to bylo až 72 hodin. Médium bylo pufované na pH 7,0. Densita buněk byla  $5 \times 10^3 \pm 0,2$  CFU/ml. Odečítání probíhalo vizuálně (MIC = IC<sub>80</sub>, IC<sub>50</sub> u vláknitých hub). Klinicky používané antimykotikum nystatin (NYS) byl použit jako standard.

Látky opět nevykazovaly žádnou aktivitu v testovaných koncentracích.

Tabulka 6: Testované fungální kmeny

Testované kmeny (kód/číslo)	
1. <b>CA</b> <i>Candida albicans</i> ATCC 44859	5. <b>TA</b> <i>Trichosporon asahii</i> 1188
2. <b>CT</b> <i>Candida tropicalis</i> 156	6. <b>AF</b> <i>Aspergillus fumigatus</i> 231
3. <b>CK</b> <i>Candida krusei</i> E28	7. <b>LC</b> <i>Lichtheimia corymbifera</i> 272
4. <b>CG</b> <i>Candida glabrata</i> 20/I	8. <b>TM</b> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445

Tabulka 7: Výsledky testování na antifungální aktivitu

Kmen (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								
		JZ-AJ1	JZ-AJ2	JZ-AJ3	JZ-AJ4	JZ-AJ5	JZ-AJ6	JZ-AJ8	JZ-AJ9	NYS
<b>CA</b>	24h	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>0,98</b>
	48h	>500	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
<b>CT</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>3,9</b>
<b>CK</b>	24h	>500	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>3,9</b>
<b>CG</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
<b>TA</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
<b>AF</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>1,95</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>3,9</b>
<b>LC</b>	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>15,62</b>
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>31,25</b>
<b>TM</b>	72h	>500	<b>500</b>	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	<b>3,9</b>
	120h	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	<b>7,81</b>



Tabulka 8: Výsledky testování na antifungální aktivitu (pokračování)

Kmen (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC/IC <sub>80</sub> /IC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )								
		JZ-125	JZ-126	JZ-127	JZ-128	JZ-129	JZ-130	JZ-131	JZ-132	NYS
CA	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>0,98</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
CT	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>3,9</b>
CK	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>3,9</b>
CG	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
TA	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
AF	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>1,95</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>3,9</b>
LC	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>15,62</b>
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>31,25</b>
TM	72h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>3,9</b>
	120h	>125	>500	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>7,81</b>

#### 4.5.4 Antivirotická aktivita

Poslední testovanou aktivitou u těchto látek byla aktivita antivirotická. Jednalo se o Vesicular stomatitis virus, Coxackie virus B4, respiční syncytiální virus, virus Para-influenzy-3, Reovirus-1, Sindbis virus, Punta Toro virus, Adenovirus 2, dále následující herpetické viry – Herpes simplex virus-1, Herpes simplex virus-2, Herpes simplex virus-1, chřipkové viry - Influenza A/H1N1 (A/PR/8), Influenza A/H1N1 (A/Virginal/ATCC3/2009), Influenza A/H3N2 (A/HK/7/87), Influenza B (B/HK/5/72) a Vaccinia virus.

Aktivita látek byla sledována na více typech buněk – HEL lidské buňky plicních embryonálních fibroblastů, HeLa buňky karcinomu děložního hrdla (Henrietty Lacksové), dále na MDCK psích (Madin-Darby Canine Kidney), kočičích CRFK ledvinných buňkách (Crandell-Rees Feline Kidney), i Vero buňkách (ledvinné buňky kočkodana zeleného). HIV viry byly testovány na MT4 lymfoblastických buňkách myši.

Testování probíhalo standardně [55]. Buněčné kultury byly naneseny na 96 - jamkové destičky a byly přidány sériově ředěné testované sloučeniny. Inkubace probíhala typicky

tří až šest dní. Vyhodnocení bylo provedeno mikroskopicky (vyjádřeno jako EC<sub>50</sub> – koncentrace látky potřebná pro 50 % maximálního účinku). Cytotoxicita a citlivost virů chřipky byla vyhodnocena pomocí kolorimetrické metody s MTS. MTS činidlo je buňkami redukováno na barvivo formazan, který je nerozpustný v kultivačním médiu a tvoří v něm krystaly. Měření absorbance roztoků probíhá při 490-500 nm.

Pouze čtyři látky vykazovaly mírnou antivirotickou aktivitu na Influenza A/H1N1 (A/PR/8), Influenza A/H1N1(A/Virginial/ATCC3/2009), Influenza A/H3N2 (A/HK/7/87). Tato zaznamenaná aktivita ale byla oproti léčivům používaných v běžné praxi asi desetkrát až stokrát slabší. Ostatní sledované viry nevykazovaly žádnou citlivost na testované látky.

Tabulka 9: Výsledky testování na antivirotickou aktivitu

Látka	MCC <sup>a</sup>	<i>Influ. A/H1N1</i> (A/PR/8)		<i>Influ. A/H1N1</i> (A/Virginial/ATCC3/2009)		<i>Influ. A/H3N2</i> (A/HK/7/87)	
		Vizuálně (μM)	MTS (μM)	Vizuálně (μM)	MTS (μM)	Vizuálně (μM)	MTS (μM)
<b>JZ-AJ9</b>	>100	52	48	72	61	63	43
<b>JZ-127</b>	>100	>100	>100	>100	74	100	62
<b>JZ-128</b>	>100	>100	>100	>100	73	>100	>100
<b>JZ-129</b>	>100	>100	>100	>100	67	>100	>100
<b>zanamivir</b>	>100	<b>4,0</b>	<b>1,5</b>	<b>19</b>	<b>6,4</b>	<b>6,8</b>	<b>6,9</b>
<b>ribavirin</b>	≥20	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>8,9</b>	<b>8,5</b>	<b>20</b>	<b>6,6</b>

<sup>a</sup>MCC – minimální cytotoxická koncentrace na MDCK buňky, definovaná jako nejnižší koncentrace látky, která způsobí mikroskopicky detekovatelné morfoloické změny buněk

#### 4.5.5. Hodnocení cytotoxicity

V rámci měření antivirotické aktivity připravených sloučenin byla hodnocena *in vitro* cytotoxicita na následujících buněčných liniích:

- CRFK - Crandell-Rees Feline Kidney Cell – buňky epitelu kočičích ledvin
- HeLa – Henrietty Lacksové – buňky karcinomu děložního hrdla
- HEL – lidské buňky plicních embryonálních fibroblastů
- Vero – ledvinné buňky kočkodana zeleného
- MDCK - Madin-Darby Canine Kidney – psí ledvinné buňky
- MT4 – myší T4 lymfocyty

Buňky byly umístěny do 96 - jamkové destičky a přidány sériově řaděné testované látky. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C po dobu čtyř až šesti dnů, hustota buněk v jamce byla  $1 \times 10^4$ . Negativní kontrolou byly buněčné linie neošetřené testovaným léčivem. Cytotoxicita byla vyjádřena jako minimální cytotoxická koncentrace (MCC, nejnižší koncentrace sloučeniny, která vyvolala mikroskopicky viditelné morfologické změny buněk) a/nebo jako  $IC_{50}$  určená pomocí kolorimetrického stanovení založeném na MTS eseji.

Až na následující výjimky (JZ-130,  $MCC \geq 20 \mu M$ , Vero buňky; JZ-133,  $MCC \geq 102 \mu M$ , MT4 buňky; JZ-AJ 6,  $MCC \geq 61,60 \mu M$ , MT4 buňky) nebyla v testovaných koncentracích (do 125  $\mu M$  pro MT4 linii a 100  $\mu M$  pro ostatní linie) zjištěna žádná cytotoxicita. Připravené látky proto můžeme dle dosavadních výsledků považovat za netoxické.

Tabulka 10: Souhrnné výsledky testování [56]

Látka	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<i>M. tbc</i> (µg/ml)	<i>M. tbc</i> (µM)	<i>M.kans</i> (µg/ml)	<i>M.avium</i> (µg/ml)	<i>Influ</i> <sup>a</sup> (µM)	log <i>P</i>	MPC <sup>b</sup>
VL 1	H	H	>100	-	>100	>100	>100	0,50	0,464
JZ-AJ 1	CH <sub>3</sub> -O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	H	<b>50</b>	<b>183,6</b>	>100	>100	>100	0,65	0,093
JZ-AJ 2	CH <sub>3</sub> -O-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	H	<b>25</b>	<b>87,3</b>	>100	>100	>100	0,75	0,128
JZ-AJ 3	HO-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	H	>100	-	>100	>100	>100	0,28	0,062
JZ-AJ 4	HO-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	H	>100	-	>100	>100	>100	0,39	0,081
JZ-AJ 5	HO-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	H	<b>25</b>	<b>87,3</b>	>100	>100	>100	0,84	0,111
JZ-AJ 6	HO-C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	H	<b>12,5</b>	<b>41,6</b>	>100	>100	>100	1,26	0,166
JZ-AJ 8	Ph-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	H	<b>12,5</b>	<b>39,3</b>	>100	>100	>100	3,23	1,000
JZ-AJ 9	Ph-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	H	<b>25</b>	<b>75,2</b>	>100	>100	<b>61</b>	2,81	1,000
VL 2	H	Cl	>100	-	100	100	>100	1,06	0,463
JZ-127	HO-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	<b>74</b>	0,84	0,094
JZ-125	HO-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	>100	0,95	0,132
JZ-126	HO-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	>100	1,40	0,011
JZ-128	HO-C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	<b>73</b>	1,82	0,073
JZ-129	Ph-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	<b>67</b>	3,37	1,000
JZ-130	Ph-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	>100	3,79	1,000
JZ-131	CH <sub>3</sub> -O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	>100	1,20	0,052
JZ-132	CH <sub>3</sub> -O-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	Cl	>100	-	>100	>100	>100	1,31	0,05
PZA	-	-	6,25	50,8	100	>100	-	-1,31	-
INH	-	-	0,2-0,39	1,5-0,8	1,6-6,25	12,5	-	0,64	-

<sup>a</sup>*Influ* = Influenza A/H1N1

<sup>b</sup>MPC = MycPermCheck – míra propustnosti [57]

## 5 Diskuze

Tato série derivátů pyrazinamidu byla připravena z výchozích látek *N*-fenyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidu či *N*-(2-chlorfenyl)-5-chlorpyrazin-2-karboxamidu, ke kterým byly v nadbytku (pro rychlejší průběh reakce) přidávány příslušné aminy. Reakce probíhaly za mírných podmínek (reflux v ethanolu, t.v. 78 °C) přibližně dvě hodiny. Mechanismem reakcí byla nukleofilní substituce chloru na pyrazinovém jádře alifatickými aminy, za odštěpení molekuly kyseliny chlorovodíkové.

Výtěžky se u připravených látek pohybovaly v rozmezí od 43-87 %, průměrná hodnota výtěžku činila 62,3 %. Ztráty byly zřejmě způsobeny čistícími metodami konečných produktů (adsorpce na silikagel, čištění pomocí flash chromatografie, rekrystalizace).

Po syntéze látek následovalo určení jejich  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR a IČ spekter na katedře anorganické a organické chemie, data z této analýzy nám potvrdila předpokládané struktury produktů. V naší laboratoři byla provedena kontrola pomocí TLC a stanovena teplota tání v otevřené kapiláře. Všechny připravené látky byly pevného skupenství, měly bílou barvu, případně slabě nažloutlou.

Další důležité charakteristiky látek  $\log P$  a  $\text{Clog } P$ , které vypovídají o lipofilitě látek, byly vypočítány pomocí programu ChemDraw. Hodnoty  $\log P$  se pohybovaly od 0,28 u látky JZ-AJ 3 po 3,79 u JZ-130. Dle výše uvedeného grafu (Graf 2: Srovnání účinnosti na *M. tbc* H37Rv s látkami s alkylaminosubstituenty) můžeme odvodit, že ideální hodnota  $\log P$  se u těchto látek pohybuje přibližně od 2,5 do 3,5. Látkami, které vykazovaly nejvyšší účinnost, byly látky s hexylamino- a heptylamino-substituentem v postranním řetězci [56]. Měly přibližně stejnou hodnotu  $\log P$  jako sloučeniny s fenylovým jádrem v postranním řetězci, které ovšem vykazovaly výrazně sníženou účinnost. Z těchto výsledků vyplývá, že zavedení fenylového jádra do postranního řetězce nepřineslo příznivé ovlivnění aktivity. Zřejmě k tomuto faktu přispěla snížená flexibilita postranního řetězce pro vstup do mykobakteriální buňky. Dále nás u těchto látek zajímalo, zda  $\pi$ - $\pi$  interakce u fenylového jádra, pozitivně ovlivní interakci s cílovou strukturou [58][59]. To se bohužel nepotvrdilo a látky vykazovaly jen nízkou účinnost proti *M. tbc* H37Rv, proti bakteriálním a fungálním patogenům byly neúčinné.

Míra lipofility je u antituberkulotik velice důležitá. Spolu s veličinou MycPermCheck (*in silico* vypočtená pravděpodobnost průniku sloučeniny do mykobakteriální buňky) nám charakterizuje prostup látky přes mykobakteriální buněčnou stěnu. Látky definované jako plně prostupné mají hodnoty MycPermCheck vyšší než 0,82, látky s hodnotami pod 0,55 jsou považovány za neprostupné [56][57]. Reálně ale mohou procházet látky i s nižšími hodnotami MycPermCheck. Z tohoto hlediska můžeme vyvodit několik závěrů vůči látkám, které jsem syntetizovala.

Přes optimální hodnoty  $\log P$  a MycPermCheck u látek JZ-AJ 8, JZ-AJ 9 byla aktivita jen mírná, u látek JZ-129, JZ-130 nebyla prokázána žádná účinnost. Výchozí látky VL1, VL2, ač jsou hodnoceny jako neprostupné, vykazují vyšší účinnost než fenylalkylaminoderiváty (Tabulka 10, Souhrnné výsledky testování). Hodnota prostupnosti nám tedy nekoreluje s mírou účinnosti, ale velmi nízká hodnota MycPermCheck nám předurčuje inaktivitu dané látky. Prostupnost látek přes buněčnou stěnu je tudíž základním předpokladem pro účinnost látky

Čím delší alkylaminový postranní řetězec, tím vyšší lipofilita a prostupnost látky přes vysoce lipofilní mykobakteriální buněčnou stěnu [56]. Tento poznatek byl zjištěn již dříve, při hodnocení antimykobakteriální aktivity jiných alkylamino-derivátů pyrazinamidu. Kromě zvýšení lipofility zde může důležitou roli hrát také alkylový řetězec strukturně podobný dlouhým řetězcům mykolových kyselin a jejich následná interakce [60]. Tento vztah platí u látek, které nemají postranní řetězec modifikovaný hydroxy- či methoxysubstituentem. Jak je vidět z tabulky (Tabulka 10: Souhrnné výsledky testování) všechny methoxyalkylamino- a hydroxyalkylaminoderiváty jsou neprostupné. Jejich hodnoty MycPermCheck se pohybují od 0,011-0,128. Je to díky snížené lipofilně a zřejmě schopnosti tvorby vodíkových vazeb s ostatními strukturami, což znesnadňuje průnik do mykobakteriální buňky. Také se nám u těchto látek bohužel nepotvrdilo, že by schopnost tvorby vodíkových můstků ovlivnilo interakci s cílem a došlo ke zvýšení účinnosti.

Mnou připravené látky byly spolu s látkami s alkyly v postranním řetězci publikované v recenzovaném zahraničním impaktovaném časopise [56]. Dříve nebyla žádná z nich publikovaná.

## 6 Závěr

Byla připravena série derivátů 5-alkylamino-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidů (či 5-alkylamino-*N*-(2-chlorfenzylpyrazin)-2-karboxamidů) s terminální methoxy-, hydroxyskupinou nebo fenylem v postranním alkylaminovém řetězci. Cílem bylo zjistit, do jaké míry bude ovlivněna účinnost u látek se sníženou lipofilitou, vlivem hydroxy- a methoxy skupin, které jsou rovněž schopny tvořit vodíkové můstky. Z porovnání s dříve připravenými 5-alkylamino-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidy, které obsahují nepozměněný alkylový řetězec, vyplývá, že výše zmíněné obměny alkylamino substituentu byly z hlediska antimykobakteriální aktivity nepříznivé.

Ani u látek se zavedeným fenylem v postranním řetězci nebyla aktivita větší. Přes optimální hodnoty log *P* u 5-fenzylalkylamino derivátů (AJ-JZ 8, AJ-JZ 9), byla aktivita jen mírná (Tabulka 10: Souhrnné výsledky testování). Můžeme tedy usoudit, že pro účinnost je kromě dostatečné lipofility důležitá i flexibilita postranního řetězce. U těchto látek se nám bohužel nepotvrdil předpoklad, že by účinnost mohla být pozitivně ovlivněna pomocí  $\pi$ - $\pi$  interakcí s hypotetickým receptorem.

Můžeme tedy konstatovat, že míra prostupnosti roste s prodlužujícím se jednoduchým postranním řetězcem, tedy s rostoucí lipofilitou. Je to důležitá determinanta pro účinnost, ale ne jediná a dle ní nemůžeme jednoznačně určit účinnost látek

Byla připravena tato série derivátů pyrazinamidu jako potencionálních antituberkulotik:

- 1) *N*-fenzyl-5-[(2-methoxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 2) *N*-fenzyl-5-[(3-methoxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 3) *N*-fenzyl-5-[(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 4) *N*-fenzyl-5-[(3-hydroxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 5) *N*-fenzyl-5-[(4-hydroxybutyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 6) *N*-fenzyl-5-[(5-hydroxypentyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 7) *N*-fenzyl-5-[(2-fenylethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 8) *N*-fenzyl-5-[(3-hydroxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 9) *N*-(2-chlorfenzyl)-5-[(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 10) *N*-(2-chlorfenzyl)-5-[(3-hydroxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 11) *N*-(2-chlorfenzyl)-5-[(4-hydroxybutyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

- 12) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(5-hydroxypentyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 13) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(2-metoxyethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 14) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(3-metoxypropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 15) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(2-fenylethyl)amino]pyrazin-2-karboxamid
- 16) *N*-(2-chlorfenyl)-5-[(fenylpropyl)amino]pyrazin-2-karboxamid

V teoretické části jsem se zaměřila na charakterizaci a problematiku tuberkulózy v dnešní době nejen u nás, ale i ve světě, na látky, které se běžně terapeuticky využívají i na ty, které jsou předmětem klinického zkoušení.

V praktické části jsem popsala postup práce v laboratoři při syntéze nových struktur a uvedla vyhodnocení  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ spekter. Pomocí programu ChemDraw byly vytvořeny chemické vzorce, vypočteny charakteristiky jako  $\log P$ ,  $\text{Clog } P$  a elementární analýza. Všechny nově připravené sloučeniny byly testovány na aktivitu antimykobakteriální, antifungální, antibakteriální a antivirotickou. Pouze látky JZ-AJ 1, JZ-AJ 2, JZ-AJ5, JZ-AJ6, JZ-AJ 8, JZ-AJ9 byly mírně účinné proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Antifungální a antibakteriální účinnost nebyla zjištěna. Látky JZ-AJ 9, JZ-127, JZ-128, JZ-129 vykazovaly nízkou aktivitu proti Influenza A virům.



## 7 Abstrakt

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Řešitel: Alena Janoutová**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jan Zitko, PhD.**

**Název diplomové práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika IV**

Výzkum léčiv, potenciálně účinných proti tuberkulóze, probíhá na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové již několik let.

V této práci jsem se zaměřila na nové deriváty pyrazimanidu syntetizované jako potenciální antituberkuloticky účinná léčiva. Samotný pyrazinamid je antituberkulotikem 1. linie a je součástí všech léčebných programů. Předlohou pro konečné sloučeniny byl již dříve připravený 5-alkylamino-*N*-fenyropyrazin-2-karboxamid, který vykázal slibnou *in vitro* antibakteriální aktivitu s hodnotami MIC v rozmezí od 0,78 do 3,13 µg/ml. Cílem mé práce bylo ověřit účinnost derivátů s modifikovaným postranním řetězcem, které obsahují fenylyalkylamino-, hydroxyalkylamino- či methoxyalkylaminový substituent.

Konečné sloučeniny byly připraveny nukleofilní substitucí chloridu příslušnými aminy v prostředí ethanolu. Po všech čistících krocích se výtěžky reakcí pohybovaly v rozmezí 43-87 %. Všechny látky byly charakterizovány pomocí <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, IČ spekter, elementární analýzou a teplotou tání.

Všechny syntetizované sloučeniny byly testovány na *in vitro* antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální a antivirotickou aktivitu. Pouze šest sloučenin z celkových 16 vykazovalo mírnou aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC =12,5-50 µg/ml, MIC(PZA) = 6,25 µg/ml). U čtyř látek byla zaznamenána nízká antivirotická aktivita (proti více typům Influenza viru). Ostatní látky byly neúčinné na *M. kansasii*, *M. avium* a ostatní testované patogeny.

## 8 Abstract

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control**

**Author: Alena Janoutová**

**Supervisor: PharmDr. Jan Zitko, PhD.**

**Title of diploma thesis: Pyrazine Derivatives as Potential Antituberculosis Drugs IV**

Drug research, potentially effective against tuberculosis, progress already for several years in the Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

This study is focused on new derivatives of pyrazinamide (PZA) prepared as potential antituberculars. PZA itself is a well-established first-line antitubercular agent and a constituent of all basic tuberculosis treatment regimens. The design of final compounds was based on the previously synthesized 5-alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides<sup>1</sup>, which possessed promising *in vitro* antimycobacterial activity with MIC ranging from 0.78 to 3.13 µg/mL. The object of this study was to test the activity of derivatives with alkylamino chain modified with terminal phenyl, hydroxyl or methoxy group.

Final compounds were prepared by nucleophilic substitution of chlorine with respective amines in refluxing EtOH. Reaction yields, after all purification steps, were 58-87%. Compounds were characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, IR, elementary analysis and melting point.

Final compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial, antibacterial, antifungal and antiviral activity. Only six substances, out of total of 16 newly prepared, showed moderate activity against *M. tuberculosis* H37Rv (MIC =12,5-50 µg/mL, MIC(PZA) = 6,25 µg/mL). For four substances were found low antiviral activity (against more types of Influenza virus). All compounds were ineffective against *M. avium* and other tested

pathogens. All compounds with R2 = Cl were inactive. Detailed structure-activity relationships will be discussed.

## 9 Seznam použité literatury

- [1] LUKÁŠ, K.; ŽÁK, A. a kol, *Chorobné znaky a příznaky*, 2010, str. 62, Grada Publishing a.s., [ISBN 978-80-247-7028-4]
- [2] MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J.; DVOŘÁČKOVÁ, J.; *Patologie*, 2. doplněné vydání, 2012, str. 103-105, Grada Publishing a.s., [ISBN 978-80-247-7770-2]
- [3] LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M.; *Farmakologie a toxikologie*, překlad 15., zcela přepracované vydání, 2004, str. 521-252, Grada Publishing a.s., [ISBN 80-247-0836-1]
- [4] ČEŠKA, R.; TESAŘ, V.; DÍTĚ, P.; ŠTULC, T.; *Interna*, 1. vydání, 2012, str. 481-485, Triton, [ISBN 978-80-738-7629-6]
- [5] MUNTAU, A. C.; *Pediatric*, překlad 6. vydání, 2014, str. 172-176, Grada Publishing a.s., [ISBN 97-880-247-4588-6]
- [6] World Health Organization, Tuberculosis, Key facts, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>, [cit. 10.4.2015]
- [7] BÁRTŮ, V.; Tuberkulóza – infekční choroba v 21. století, *Medicína Pro Praxi*, 2008; vol. 5., str. 245–248, [ISSN 1214-8687]
- [8] PTÁKOVÁ, M.; Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz, *Medicína pro praxi*, 2011, str. 466-468, [ISSN 1803-5310]
- [9] KOLEK, V.; Tuberkulóza – transformace péče, její výhody a rizika, *Medicína pro praxi*, 2012, str. 220–221, [ISSN 1214-8687]
- [10] Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, *Tuberkulóza a respirační nemoci 2013*, ÚZIS ČR, [ISSN 1210-8685]
- [11] Ministerstvo zdravotnictví České republiky, Vyhláška č. 299 / 2010 Sb., [http://www.mzcr.cz/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-\\_2464\\_5.html](http://www.mzcr.cz/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-_2464_5.html), [cit. 29.10.2014]
- [12] Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Aktuální informace č. 55/2012, <http://www.uzis.cz/rychle-informace/tuberkuloza-evrope-roce-2010-na-zaklade-vysledku-tuberculosis-surveillance-europe>, [cit. 10.4.2015]

- [13] GLAZIOU, P.; SISMANIDIS, C.; FLOYD, K.; RAVIGLIONE, M.; Global Epidemiology of Tuberculosis, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, vol. 5, [ISSN 2157-1422]
- [14] World Health Organization, Global tuberculosis report 2014, [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/), [cit. 15.4.2015]
- [15] World Health Organization, Estimated TB incidencerates, 2013, [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_TBincidence\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TBincidence_2013.png), [cit. 15.4.2015]
- [16] KOZÁK, K.; Současný stav tuberkulózy ve světě, *Postgraduální medicína*, 2003, vol. 5, str. 507-508, [ISSN 1212-4184]
- [17] MARTÍNKOVÁ, J. a kolektiv; *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2007, str. 319-321, Grada Publishing a.s., [ISBN 978-80-247-1356-4]
- [18] SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X.; YUAN, H.; LEE, J. S.; BARRY, C. E.; WANG, H.; ZHANG, W.; ZHANG, Y., Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis, *Science*, 2011, vol. 333, str. 1630-1632, [ISSN 1095-9203]
- [19] PERSONNE, Y.; PARISH T.; Mycobacterium tuberculosis possesses an unusual tmRNA rescue system, *Tuberculosis*, 2014, vol. 52, str. 34-42, [ISSN 1472-9792]
- [20] GIUDICE, E.; MACE, K.; GILLET, R., Trans-translation exposed: understanding the structures and functions of tmRNA-SmpB, *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, [ISSN 1664-302X]
- [21] ZHANG, Y.; WADE, M. M.; SCORPIO, A.; ZHANG, H.; ZHONGHE, S.; Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, vol. 52, str. 790–795, [ISSN 0305-7453]
- [22] DARMAWATI, A.; KUSUMANINGRUM, D.; Identification of mycolic acids of Mycobacterium Tuberculosis by Gas chromatography – flame ionization detector, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, vol. 6, str. 460-464, [ISSN 0975-1491]

- [23] BÁRTŮ, V.; Tuberkulóza a její rezistentní formy, *Interní medicína pro praxi*, 2007, vol. 9, str. 372-373, [ISSN 1212-7299]
- [24] HEYM, B.; COLE, S. T.; Multidrug resistance in Mycobacterium Tuberculosis, *International Journal of Antimicrobial Agents* 8, 1997, str. 61-70, [ISSN 0924-8579]
- [25] WANG, F.; LANGLEY, R.; GULTEN, G.; DOVER, L. G.; BESRA, G. S.; JACOBS, W. R.; SACCHETTINI, J. C., Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *Journal of Experimental Medicine* , 2007, vol. 204, str. 73-78, [ISSN 0022-1007]
- [26] PROSSER, G. A.; DE CARVALHO, L. P. S.; Reinterpreting the Mechanism of Inhibition of Mycobacterium tuberculosis d -Alanine: d -Alanine Ligase by d - Cycloserine. *Biochemistry* , 2013, vol. 52, str. 7145-7149, [ISSN 0006-2960]
- [27] ZHENG, J.; RUBIN, E. J.; BIFANI, P.; MATHYS, V.; LIM, V.; AU, M.; JANG, J.; NAM, J.; DICK, T.; WALKER, J. R.; PETHE, K.; CAMACHO, L. R.; Para-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in Mycobacterium tuberculosis, *Journal of Biological Chemistry* , 2013, vol., str. 28951-28951, [ISSN 0021-9258]
- [28] PHAM, D. D.; FATTAL, E.; TSAPIS, N.; Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment, *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, vol. 478, str. 517-529, [ISSN 0378-5173]
- [29] SHEHZAD, A.; REHMAN, G.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; LEE, Y. S.; Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2013, vol. 17, str. 74-81, [ISSN 1413-8670]
- [30] KRATKY, M.; Advances in the Development of Antitubercotics Acting on Multidrug-Resistant Strains, *Chemické listy*, 2010, vol. 104, str. 998-1005, [ISSN 0009-2770]
- [31] KANA, B. D.; KARAKOUSIS, P. C.; PARISH, T.; DICK, T.; Future target-based drug discovery for tuberculosis?, *Tuberculosis*, 2014, vol. 94, str. 551-556, [ISSN 1472-9792]
- [32] VILLEMAGNE, B.; CRAUSTE, C.; FLIPO, M.; BAULARD, A. R.; DÉPREZ, B.; WILLAND, N.; Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, vol. 51, str. 1-16, [ISSN 0223-5234]

- [33] DUTTA, K. N.; KARAKOUSIS, P. C.; PA-824 is as effective as isoniazid against latent tuberculosis infection in C3HeB/FeJ mice, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, vol. 44, str. 564-566, [ISSN 0924-8579]
- [34] GLER, M. T.; SKRIPCONOKA, V.; SANCHEZ-GARAVITO, E.; XIAO, H.; CABRERA-RIVERO, J. L.; VARGAS-VASQUEZ, D. E.; GAO, M.; AWAD, M.; PARK, STR. K.; SHIM, T. STR.; SUH, G. Y.; DANILOVITS, M.; OGATA, H.; KURVE, A.; CHANG, J.; SUZUKI, K.; TUPASI, T.; KOH, W. J.; SEAWORTH, B.; GEITER, L. J.; WELLS, C. D.; Delamanid for Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis, *New England Journal of Medicine*, 2012, vol. 366, str. 2151-2160, [ISSN 0028-4793]
- [35] BLAIR, A. H.; SCOTT, L. J.; Delamanid: A Review of Its Use in Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis, *Drugs*, 2015, vol. 75, str. 91-100, [ISSN 0012-6667]
- [36] LU, Y.; ZHENG, M.; WANG, B.; FU, L.; ZHAO, W.; LI, P.; XU, J.; ZHU, H.; JIN, H.; YIN, D.; HUANG, H.; UPTON, A. M.; MA, Z.; Clofazimine Analogs with Efficacy against Experimental Tuberculosis and Reduced Potential for Accumulation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, vol. 55, str. 5185-5193, [ISSN 0066-4804]
- [37] LI, D.; SHENG, L.; LIU, X.; YANG, STR.; LIU, Z.; LI, Y.; Determination of TBI-166, a Novel Antituberculous, in Rat Plasma by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia*, 2014, vol. 77, str. 1697-1703, [ISSN 0009-5893]
- [38] ISHIZAKI, Y.; HAYASHI, C.; INOUE, K.; IGARASHI, M.; TAKAHASHI, Y.; PUJARI, V.; CRICK, D. C.; BRENNAN, P. J.; NOMOTO, A.; Inhibition of the First Step in Synthesis of the Mycobacterial Cell Wall Core, Catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate Transferase WecA, by the Novel Caprazamycin Derivative CPZEN-45, *Journal of Biological Chemistry*, 2013, vol. 288, str. 30309-30319, [ISSN 0021-9258]
- [39] HANIF, STR. N. M.; HICKEY, A. J.; GARCIA-CONTRERAS, L.; Liquid chromatographic determination of CPZEN-45, a novel anti-tubercular drug, in biological samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, vol. 88, str. 370-376, [ISSN 0731-7085]
- [40] BOGATCHEVA, E.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; DE LOS SANTOS, G.; REDDY, V.; CHEN, P.; BARBOSA, F.; EINCK, L.; NACY, C.; PROTOPOPOVA, M.;

Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online], 2011, vol. 21, str. 5353-5357, [ISSN 0960-894X]

[41] AGRAWAL, R.; ADDISON, P.; SAIHAN, Z.; PEFKIANAKI, M.; PAVESIO, C.; Optic Neuropathy Secondary to Linezolid for Multidrug-resistant Mycobacterial Spinal Tuberculosis, *Ocular Immunology & Inflammation*, 2015, vol. 23, str. 90-92, [ISSN 0927-3948]

[42] WEISS, T.; SCHONFELD, N.; OTTO-KNAPP, R.; BOS, L.; BETTERMANN, G.; MAUCH, H.; BAUER, T. T.; RUSSMANN, H.; Low minimal inhibitory concentrations of linezolid against multidrug-resistant tuberculosis strains, *European Respiratory Journal*, 2014, vol. 45, str. 285-287, [ISSN 0903-1936]

[43] PRASAD, J. V.; New oxazolidinones, *Current Opinion in Microbiology*, 2007, vol. 10, str. 454-460, [ISSN 1369-5274]

[44] WALLIS, R. STR.; DAWSON, R.; FRIEDRICH, STR. O.; VENTER, A.; PAIGE, D.; ZHU, T.; SILVIA, A.; GOBEY, J.; ELLERY, C.; ZHANG, Y.; EISENACH, K.; MILLER, P.; DIACON, A. H.; PETT, STR. L.; Mycobactericidal Activity of Sutezolid (PNU-100480) in Sputum (EBA) and Blood (WBA) of Patients with Pulmonary Tuberculosis, *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, str.e94462, [ISSN 1932-6203]

[45] ZHU, T.; FRIEDRICH, STR. O.; DIACON, A.; WALLIS, R. STR.; Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis of the Bactericidal Activities of Sutezolid (PNU-100480) and Its Major Metabolite against Intracellular Mycobacterium tuberculosis in Ex Vivo Whole-Blood Cultures of Patients with Pulmonary Tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, vol. 58, str. 3306-3311, [ISSN 0066-4804]

[46] VERA-CABRERA, L.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J.; OCAMPO-CANDIANI, J.; WELSH, O.; CHOI, STR. H.; MOLINA-TORRES, C. A.; In Vitro Activities of the Novel Oxazolidinones DA-7867 and DA-7157 against Rapidly and Slowly Growing Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006-11-22, vol. 50, str. 4027-4029, [ISSN 0066-4804]

[47] BALASUBRAMANIAN, V.; SOLAPURE, STR.; SHANDIL, R.; GAONKAR, STR.; MAHESH, K. N.; REDDY, J.; DESHPANDE, A.; BHARATH, STR.; KUMAR, N.; WRIGHT, L.; MELNICK, D.; BUTLER, STR. L.; Pharmacokinetic and Pharmacodynamic



Evaluation of AZD5847 in a Mouse Model of Tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, vol. 58, str. 4185-4190, [ISSN 0066-4804]

[48] BALASUBRAMANIAN, V.; SOLAPURE, STR.; IYER, H.; GHOSH, A.; SHARMA, STR.; KAUR, P.; DEEPTHI, R.; SUBBULAKSHMI, V.; RAMYA, V.; RAMACHANDRAN, V.; BALGANESH, M.; WRIGHT, L.; MELNICK, D.; BUTLER, STR. L.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; Bactericidal Activity and Mechanism of Action of AZD5847, a Novel Oxazolidinone for Treatment of Tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, vol. 58, str. 495-502, [ISSN 0066-4804]

[49] AHMAD, Z.; MINKOWSKI A.; PELOQUIN, C. A.; WILLIAMS, K. N.; MDLULI, K. E.; GROSSET, J. H.; NUERMBERGER, E. L.; Activity of the Fluoroquinolone DC-159a in the Initial and Continuation Phases of Treatment of Murine Tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, vol. 55, str. 1781-1783, [ISSN 0066-4804]

[50] FLIPO, M.; DESROSES, M.; LECAT-GUILLET, N.; DIRIÉ, B.; CARETTE, X.; LEROUX, F.; PIVETEAU, C.; DEMIRKAYA, F.; LENS, Z.; RUCKTOOA, P.; VILLERET, V.; CHRISTOPHE, T.; JEON, H. K.; LOCHT, C.; BRODIN, P.; DÉPREZ, B.; BAULARD, A. R.; WILLAND, N.; Ethionamide Boosters: Synthesis, Biological Activity, and Structure–Activity Relationships of a Series of 1,2,4-Oxadiazole EthR Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 54, str. 2994-3010, [ISSN 0022-2623]

[51] WILLAND, N.; DIRIÉ, B.; CARETTE, X.; BIFANI, P.; SINGHAL, A.; DESROSES, M.; LEROUX, F.; WILLERY, E.; MATHYS, V.; DÉPREZ-POULAIN, R.; DELCROIX, D.; FRÉNOIS, F.; AUMERCIER, M.; LOCHT, C.; VILLERET, V.; DÉPREZ, B.; BAULARD, A. R.; Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide, *Nature Medicine*, 2009, vol. 15, str. 537-544, [ISSN 1078-8956]

[52] LECHARTIER, B.; HARTKOORN, R. C.; COLE, STR. T.; In Vitro Combination Studies of Benzothiazinone Lead Compound BTZ043 against Mycobacterium tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, vol. 56, str. 5790-5793 [ISSN 0066-4804]

[53] ESWARAN, STR.; ADHIKARI, A. V.; PAL, N. K.; CHOWDHURY, I. H.; Design and synthesis of some new quinoline-3-carbohydrazone derivatives as potential antimycobacterial agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 20, str. 1040-1044, [ISSN 0906-894X]

- [54] ZITKO, J.; SERVUSOVÁ, B.; PATEROVÁ, P.; MANDÍKOVÁ, J.; KUBÍČEK, V.; KUČERA, R.; HRABCOVÁ, V.; KUNEŠ, J.; SOUKUP, O. et al, Synthesis, Antimycobacterial Activity and In Vitro Cytotoxicity of 5-Chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamides, *Molecules* , 2013, vol. 18, str. 14807-14825, [ISSN 14203049]
- [55] NAESENS, L.; STEPHENS, C. E.; ANDREI, G.; LOREGIAN, A.; DE BOLLE, L.; SNOECK, R.; SOWELL, J. W.; DE CLERCQ, E., Antiviral properties of new arylsulfone derivatives with activity against human betaherpesviruses, *Antiviral Research*, 2006, vol. 72, str. 60-67, [ISSN 01663542]
- [56] ZITKO, J.; SERVUSOVÁ, B.; JANOUTOVÁ, A.; PATEROVÁ, P.; MANDÍKOVÁ, J.; GARAJ, V.; VEJSOVÁ, M.; MAREK, J.; DOLEŽAL, M.; Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, vol. 23, str. 174-183, [ISSN 0968-0896]
- [57] MERGET, B.; ZILIAN, D.; MULLER, T.; SOTRIFFER, C. A., MycPermCheck: the Mycobacterium tuberculosis permeability prediction tool for small molecules, *Bioinformatics* , 2012, vol. 29, str. 62-68, [ISSN 1367-4803]
- [58] MCGAUGHEY, G. B., Pi -Stacking Interactions, Alive and well in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, str. 15458-15463, [ISSN 0021-9258]
- [59] SINNOKROT, M. O.; SHERRILL, C. D., High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of  $\pi$ - $\pi$  Interactions in Benzene Dimers, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2006, vol. 110, str. 10656-10668, [ISSN 1089-5639]
- [60] SERVUSOVÁ, B.; PATEROVÁ, P.; MANDÍKOVÁ, J.; KUBÍČEK, V.; KUČERA, R.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J., Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 2014, vol. 24, str. 450-453, [ISSN 0960-894X]