

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



**Příprava derivátů fenyلكarbamoylpyrazin-
2-karboxylové kyseliny jako potenciálních
antituberkulotik**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce

PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Mgr. Petra Janošcová

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

Rigorózní práce vznikla za podpory grantů B-CH/1594214 a SVV 260 291.

21. 04. 2016 v Hradci Králové

.....

Mgr. Petra Janošcová

Touto cestou bych ráda poděkovala panu PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. a panu prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za vedení rigorózní práce a cenné rady při jejím zhotovování. Dále děkuji Mgr. Lucii Semelkové za rady a pomoc při zpracování výsledků v experimentální části a za úvod do problematiky.

Mgr. Petra Janošcová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Školitel: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Řešitel: Mgr. Petra Janošcová

Název rigorózní práce: Příprava derivátů fenyلكarbamoylpyrazin-2-karboxylové kyseliny jako potenciálních antituberkulotik

Tuberkulóza stále představuje velký zdravotní problém po celém světě. Stále rostoucí počet nových případů multirezistence podtrhuje potřebu vývoje nových antimykobakteriálně účinných léčiv, které budou zasahovat nové a specifické cíle. S tím souvisí také vývoj nových efektivních metod pro jejich syntézu.

Tato práce je ve svém úvodu zaměřená na shrnutí problematiky tuberkulózy a její léčbu. Dále pak na využití mikrovlnné syntézy v syntéze esterů organických kyselin. V další části je shrnuta syntéza derivátů pyrazinamidu, dnes jednoho z nejpoužívanějších antimykobakteriálně účinných léčiv, jako potencionálních antituberkulotik. Byla připravena série substituovaných 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin a série methylesterů těchto kyselin. Následně byla ověřena chemická struktura těchto látek pomocí ^1H a ^{13}C NMR a IČ spekter, byla provedena elementární analýza a změřeny teploty tání. Byly vypočteny hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$ a experimentálně změřeny hodnoty $\log k$. Následně jsme otestovali antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální aktivitu těchto nově připravených sloučenin. U tří testovaných fenyلكarbamoyl kyselin se substitucí $\text{R} = 4\text{-Br}$, $\text{R} = 2\text{-OH}$ a $\text{R} = 4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ byla zjištěna mírná antimykobakteriální aktivita, s hodnotou MIC $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *Mycobacterium tuberculosis* H37R_v. Nakonec byly diskutovány možné strukturní změny, které by mohly vést k účinnějším derivátům.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Medicinal Chemistry and Drug analysis

Consultant: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D

Student: Mgr. Petra Janošcová

Title of Thesis: Preparation of phenylcarbamoylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives as potential antitubercular drugs

Tuberculosis still represents a major public health issue all over the world. The increasing number of newly detected multi-drug resistance cases indicates that there is an urgent need of discovery of new antituberculars addressed towards new and specific targets. This is accompanied by the development of new and effective synthetic methods.

This work provides an introduction to tuberculosis and its treatment. Furthermore it covers a microwave-assisted synthesis of organic acid esters and synthesis of pyrazinamide derivatives as potential antituberculars whereas pyrazinamide is one of the most used antitubercular drugs nowadays. Series of substituted 3-(phenylcarbamoyl)pyrazine-2-carboxylic acid derivatives and their methyl esters were synthesized. Final products were characterized by ^1H and ^{13}C NMR and IR spectroscopy, elementary analysis was performed and melting point was measured. Lipophilic parameters $\log P$ and $\text{Clog } P$ were calculated and $\log k$ was measured experimentally. Antimycobacterial, antifungal and antibacterial activity of newly prepared compounds were tested. The three phenylcarbamoyl acids with $\text{R} = 4\text{-Br}$, $\text{R} = 2\text{-OH}$ and $\text{R} = 4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ substitution exerted moderate antimycobacterial activity with MIC $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ against *Mycobacterium tuberculosis* H37R_v. Structural modifications that could lead to more effective derivatives were discussed.

SEZNAM ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
antiTB	antituberkulotika
CoA	koenzym A
ČR	Česká republika
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HIV	Human Immunodeficiency Virus – virus lidské imunitní nedostatečnosti
FAS I	Fatty Acid Synthase I – synthasa mastných kyselin I
FDA	Food and Drugs Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
IČ	infračervené záření
INH	isoniazid
M. h.	molekulová hmotnost
<i>M. tbc</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NAD	nikotinamidadeninukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
QT	vzdálenost mezi kmitem Q a koncem vlny T na elektrokardiogramu
PanD	Aspartát dekarboxylasa

POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
RpsA	ribosomální protein S1
SSSR	Svaz sovětských socialistických republik
TB	tuberkulóza
tmRNA	transferová-mediátorová ribonukleová kyselina
TLC	Thin Layer Chromatography – tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialové záření
WHO	Světová zdravotnická organizace – World Health Organisation

Obsah

1	Cíl práce	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Tuberkulóza	11
2.1.1	Definice	11
2.1.2	Epidemiologie	11
2.1.3	Přenos onemocnění	14
2.1.4	Klinický obraz a diagnostika.....	14
2.2	Léčba tuberkulózy.....	16
2.2.1	Léčba standardních forem TB.....	16
2.2.2	Léčba rezistentních forem TB.....	17
2.2.3	Antituberkulotika první volby.....	18
2.2.4	Antituberkulotika druhé volby	23
2.2.5	Nově zavedená léčiva.....	27
2.3	Pyrazinamid	31
2.3.1	Mechanismus účinku.....	31
2.3.2	Farmakokinetika PZA	33
2.3.3	Nežádoucí účinky.....	33
2.3.4	Dávkování	33
2.4	Mikrovlňná syntéza.....	34
2.4.1	Princip	34
2.4.2	Mikrovlňná syntéza esterů	34
3	Experimentální část.....	37
3.1	Použité přístroje a chemikálie.....	37

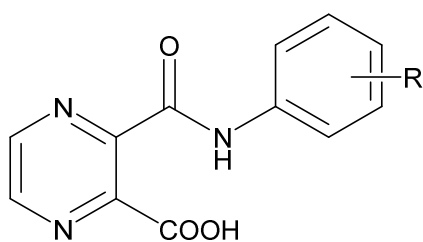
3.2	Výchozí látky	39
3.3	Postup přípravy derivátů 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny	43
3.4	Postup přípravy esterů 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny	44
3.5	Nově připravené sloučeniny.....	45
3.6	Metodika testování.....	60
3.6.1	Experimentální měření lipofility	60
3.6.2	Antimykobakteriální testování	60
3.6.3	Anifungální testování	61
3.6.4	Antibakteriální testování	61
3.7	Výsledky	62
3.7.1	Experimentální měření lipofility	62
3.7.2	Antimykobakteriální aktivita.....	63
3.7.3	Antifungální aktivita.....	65
3.7.4	Antibakteriální aktivita.....	68
4	Diskuze.....	71
5	Závěr	74
6	Použitá literatura.....	76

1 Cíl práce

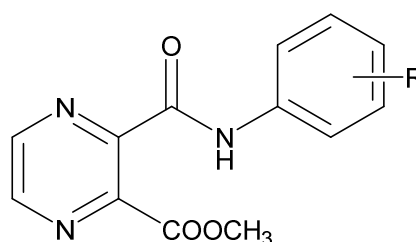
Cílem této rigorózní práce bylo připravit sérii derivátů pyrazinamidu, přesněji substituovaných kyselin fenyلكarbamoylpyrazin-2-karboxylových (1) a jejich methylesterů (2) jako potencionálních antituberkulotik. Pro tuto práci byla navržena syntéza těchto látek z důvodu vyšší lipofility oproti pyrazin-2-karboxylové kyselině (POA, $\log P = -0,66$, $\text{Clog } P = 0,0999$), aktivní formě pyrazinamidu. Zvýšením lipofility by mohlo být dosaženo snazšího prostupu lipofilním obalem mykobakteria dovnitř buňky, kde může léčivo působit. Na základě interakce POA s ribozomálním proteinem RpsA jako jedním z cílů zásahu byly v literatuře navrženy substituce POA lipofilním substituentem v poloze 5 nebo 6.¹ V této práci jsme pro porovnání zvolili substituci v poloze 3. Přípravu esterů kyselin fenyلكarbamoylpyrazin-2-karboxylových jsme zvolili kvůli dalšímu (dočasnému) zvýšení lipofility těchto látek.

U připravených látek jsme měli za cíl otestovat jejich antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální aktivitu.

Dále jsem měla vypracovat rešerši o tuberkulóze, současných přístupech k léčbě a nových látkách používaných k léčbě této nemoci.



(1)



(2)

2 Teoretická část

2.1 Tuberkulóza

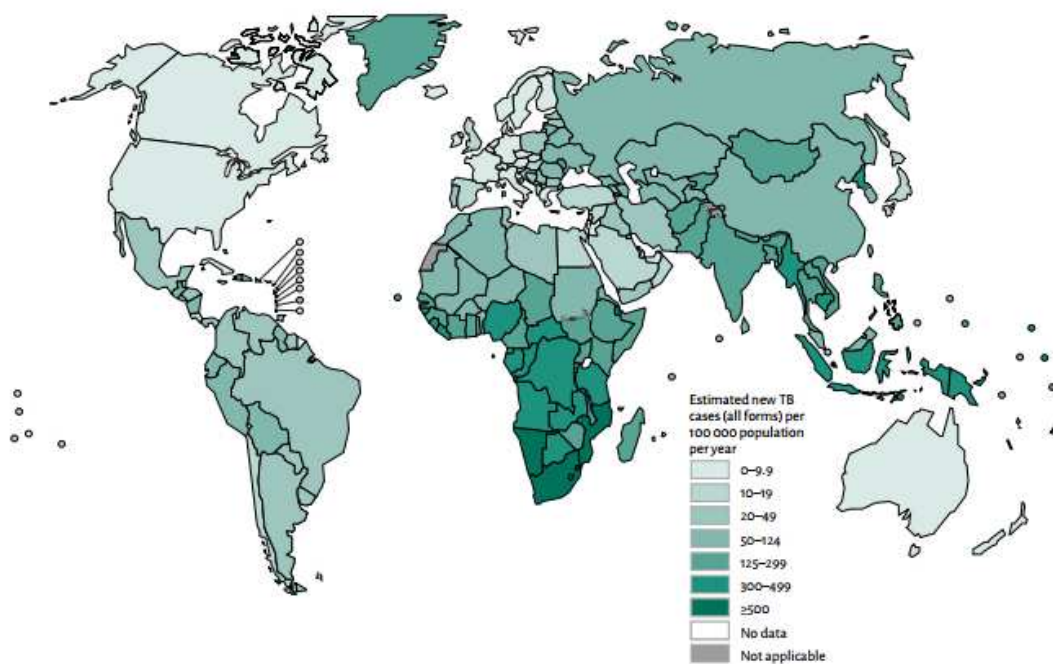
2.1.1 Definice

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění způsobené zejména bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis*, méně často pak *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium africanum*. Nejčastěji postiženým orgánem jsou plíce, ale mykobakterie mohou zasahovat i mimoplicní struktury. Výskyt mykobakterióz, které jsou vyvolané jinými, tzv. atypickými mykobakteriemi (*Mycobacterium avium* komplex, *Mycobacterium xenopi*, *kansasii*, *fortuitum*), v souvislosti se stavy s oslabenou imunitou v současnosti stoupá.^{2,3}

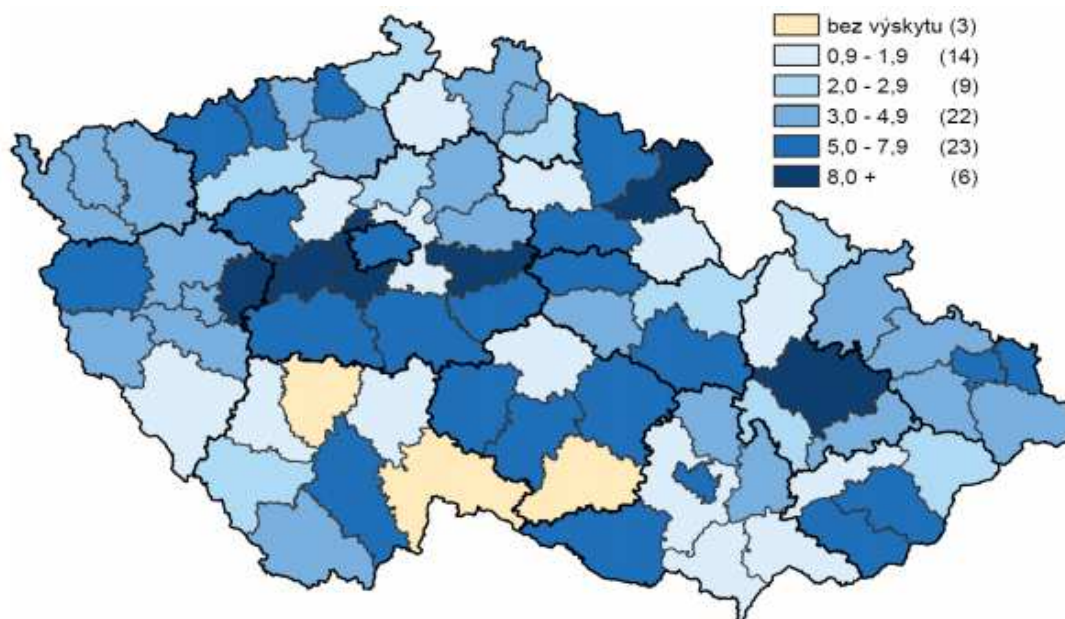
2.1.2 Epidemiologie

Tuberkulóza je v poslední době v popředí zájmu Světové zdravotnické organizace (WHO) a údaje o incidenci, prevalenci a mortalitě tohoto onemocnění ve světě se dlouhodobě výrazně nemění. Každý rok TB onemocní kolem 8 milionů lidí a 1,5 milionů na tuto nemoc umírá. V České republice (ČR) má incidence TB v posledních letech příznivý průběh. V roce 2014 bylo hlášeno celkem 514 nových případů a recidiv TB, tj. 4,9 případu na 100 000 obyvatel. Cizinci představovali 18,7 % těchto nemocných a pocházeli především z Ukrajiny, Vietnamu a Slovenska. ČR patří mezi země s příznivou situací TB. Podobná situace je i u případů multirezistentní tuberkulózy (MDR-TB). Mezi státy s významnou incidencí a prevalencí MDR-TB se řadí především bývalé země SSSR a asijské státy. Předpokládá se, že počet pacientů s MDR-TB ve světě dosáhl jednoho milionu.^{4,5,6,7}

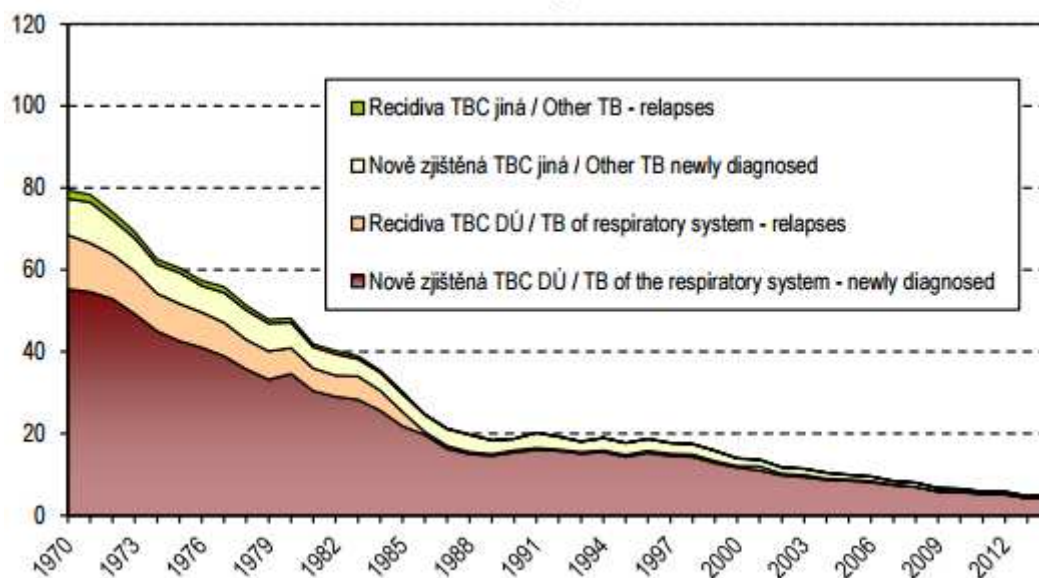
Obrázek 1 Odhadované incidence TB na 100 000 obyvatel ve světě, 2014. Převzato (se svolením) od WHO. ⁸



Obrázek 2 Počet hlášených onemocnění TB na 100 000 obyvatel v ČR. Převzato (se svolením) od ÚZIS. ⁷



Obrázek 3 Vývoj počtu hlášených onemocnění TB na 100 000 obyvatel. Převzato (se svolením) od ÚZIS.⁷



Tabulka 1 Vývoj počtu hlášených onemocnění TB v ČR. Převzato (se svolením) od ÚZIS.⁷

Rok Year	Hlášená onemocnění TB Notified cases of TB			celkem na 100 000 obyv. total per 100 000 inhab.
	dýchacího ústrojí respiratory system	jiná other	celkem total	
1989	1 560	345	1 905	18,4
1990	1 647	290	1 937	18,8
1991	1 696	383	2 079	20,2
1992	1 658	328	1 986	19,2
1993	1 601	263	1 864	18,0
1994	1 644	316	1 960	19,0
1995	1 534	300	1 834	17,8
1996	1 636	300	1 936	18,8
1997	1 557	277	1 834	17,8
1998	1 535	270	1 805	17,5
1999	1 369	262	1 631	15,9
2000	1 244	198	1 442	14,0
2001	1 185	165	1 350	13,1
2002	1 037	163	1 200	11,8
2003	1 011	151	1 162	11,4
2004	909	148	1 057	10,4
2005	896	111	1 007	9,9
2006	856	117	973	9,5
2007	790	81	871	8,4
2008	793	86	879	8,4
2009	632	78	710	6,8
2010	621	59	680	6,5
2011	557	52	609	5,8
2012	552	59	611	5,8
2013	455	47	502	4,8
2014	464	50	514	4,9

Pozn.: Hlášená onemocnění = nově zjištěná + recidivy
 Note: Notified cases = newly diagnosed + relapses

2.1.3 Přenos onemocnění

Původcem TB je *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*), objevené v roce 1882 Robertem Kochem, a dále mykobakteria *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* a *M. microti*, která jsou spolu s *M. tbc* označována jako *Mycobacterium tuberculosis* complex.⁹

Nejčastějším zdrojem nákazy je infikovaný člověk, méně často pak zvířata. Mykobakterie se šíří vzdušnou cestou a do organismu vstupují dýchacími cestami inhalací drobných kapének. Tyto kapénky vylučuje nemocný s plicní nebo laryngální tuberkulózou při kašli, kýchání, mluvení nebo zpěvu. Kapénky mohou být rovněž vytvářeny při inhalační léčbě, při bronchoskopii, při indukci sputa a při manipulaci s tkáněmi nebo sekrety v laboratoři.^{2,10}

Po vniknutí *M. tbc* do organismu dojde asi za 6 týdnů k alergické reakci IV. typu. Toto stadium se nazývá primární TB, projeví se pozitivním kožním tuberkulinovým testem (Mantoux reakce), ale nemusí docházet ke klinickým projevům. U imunokompetentních osob dochází k akumulaci aktivovaných T lymfocytů a makrofágů s tvorbou granulomů, které opouzdří mykobakteria a zamezí jejich šíření a jejich další proliferaci. V centru granulomů mohou živá mykobakteria zůstat po dlouhou dobu a za vhodnějších podmínek později vyvolat klinicky manifestní onemocnění, kdy vzniká postprimární TB. Je odhadováno, že asi u 10 % osob s latentní tuberkulózní infekcí se rozvine aktivní tuberkulóza.^{4,10}

2.1.4 Klinický obraz a diagnostika

TB může postihnout kterýkoliv orgán či tkáň. Rozeznáváme plicní a mimoplicní formy TB. Dýchací ústrojí je postiženo u 85 % nemocných a přibližně 15 % tvoří mimoplicní formy. Zde bývá nejčastěji postižena pleura, mízní uzliny, kosti, klouby, kůže, urogenitální trakt. Mimoplicní TB se často vyskytuje u osob s poruchou imunitního systému.⁴

Tuberkulóza může probíhat asymptomaticky, zejména v časnějších stádiích onemocnění a nevelkém postižení. Obvykle se příznaky objevují při progresi onemocnění. Charakteristickým je pozvolný nástup příznaků a jejich postupné zhoršování. Zejména příznaků specificky respiračních s celkově orgánově nespecifickými projevy. Proto také řada nemocných tyto projevy podcení a navštíví lékaře až po několika měsících jejich trvání. Nejčastěji se jedná o kašel, který je přítomen téměř u všech nemocných. Je trvalý, dráždivý, zpočátku suchý, později vlhký. Dalšími příznaky jsou subfebrilní teplota, pocení, nechutenství, únavnost. U pokročilých nálezů bývá přítomna hemoptýza, bolesti na prsou a dušnost. Dalším typickým projevem je také postupné hubnutí. Úbytek na váze nebývá dramatický, ale u dlouho neléčených nemocných může dojít až k padesátiprocentnímu úbytku tělesné hmotnosti během několika měsíců.^{4,10,11}

Diagnostika plicní TB je založena na klinickém obrazu, zobrazovacích metodách a mikrobiologickém průkazu tuberkulózních bacilů, případně histologického vyšetření s průkazem původce onemocnění a nepřímých diagnostických metod.^{10,12}

Nejdůležitější diagnostickou metodou je mykobakteriální vyšetření sputa nebo jakéhokoliv biologického materiálu či tkáně, která by mohla být infikována. Toto vyšetření bývá označováno jako zlatý standart v diagnostice TB. Velmi přínosným je i histologické vyšetření s průkazem specifického granulomatózního procesu s buňkami Langhansova typu a kaseózní nekrózou. K rychlému průkazu *M. tbc* se stále častěji užívají vysoce citlivé molekulárně-genetické metody založené na průkazu nukleových kyselin, kdy je identifikace možná během několika hodin. Dalším velmi důležitým vyšetřením je skiagram hrudníku v zadopřední a bočné projekci či rentgenové vyšetření plic.⁴

Nepřímé diagnostické testy TB reprezentuje snadno dostupný tuberkulinový kožní test nazývaný též jako test dle Mantoux, který je používán již desítky let a imunologický test QuantiFERON-TB Gold (QFTTB Gold) pro diagnostiku infekce i onemocnění.^{4,12}

2.2 Léčba tuberkulózy

2.2.1 Léčba standardních forem TB

Cílem léčby TB je vyléčení nemocného, prevence pozdních následků a úmrtí, prevence relapsů onemocnění a zamezení přenosu TB na osoby, které byly, anebo jsou v kontaktu s pacientem.³

Jako antituberkulotika (antiTB) se používají látky různé chemické struktury a to jak syntetického, polosyntetického či přírodního původu, působících různými mechanismy proti infekcím vyvolaných *M. tbc*, případně některými dalšími atypickými mykobakteriemi.¹³

Existuje více než dvacet léčiv, používaných k léčbě tuberkulózy. Tato léčiva se používají v různých kombinacích a podmínkách. Například některá antiTB jsou použita pouze pro léčbu nových pacientů, u kterých je nepravděpodobné, že by byli rezistentní vůči jakémukoliv antiTB.¹⁴ Jedná se o tzv. antiTB první volby s baktericidním a bakteriostatickým účinkem, která se dnes používají výhradně k léčbě TB. Mezi ně patří baktericidně působící isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, streptomycin a bakteriostatický ethambutol. Léčba se dělí na úvodní a pokračovací fázi. V úvodní fázi je podávána obvykle čtyř- až pětikombinace léků a trvá 2 až 3 měsíce. Tato fáze probíhá nejčastěji za hospitalizace, kde je pacient postupně debacilizován a pro své okolí se stává neinfekčním. V pokračovací fázi je podávána dvoj- až trojkombinace léků a léčba trvá 4 až 5 měsíců. Tato fáze probíhá zpravidla již ambulantně. Všechny léky se podávají v jedné denní dávce. Tato dlouhotrvající léčba má bohužel také závažné nežádoucí účinky. Mezi nejvýznamnější patří hepatotoxicita isoniazidu a rifampicinu. Dále pak nefrotoxicita a ototoxicita charakterizována často poruchou sluchu a závratěmi při aplikaci streptomycinu. Při užívání ethambutolu dochází k neuritidě zrakového nervu. Při léčbě pyrazinamidem se projevuje hyperurikémie a hepatotoxicita.⁴

Dále existují další antiTB, tzv. rezervní, která se používají pouze pro léčbu rezistentních forem. Jedná se o fluorochinolony, amikacin, kanamycin, kapreomycin, ethionamid, prothionamid, cykloserin, paraaminosalicylová kyselina.^{4,14}

2.2.2 Léčba rezistentních forem TB

Pokud je *M. tuberculosis* při testu citlivosti in vitro rezistentní pouze na jedno antiTB první volby, je onemocnění označováno jako monorezistentní. Polyrezistentní je pak tehdy, je-li rezistence kmene na více než jedno antiTB první volby mimo současně vyskytující se rezistenci na isoniazid a rifampicin. Rezistence minimálně na kombinaci dvou nejúčinnějších léků isoniazidu a rifampicinu se nazývá multirezistence. V posledních letech byla zjištěna tzv. XDR-TB rezistence – extenzivní léková rezistence. Jedná se o *M. tuberculosis*, které je kromě rezistence na isoniazid a rifampicin odolné na jakýkoliv fluorochinolon a současně minimálně na jedno ze tří parenterálních antibiotik – kapreomycin, kanamycin a amikacin.^{5,15}

Rezistence na antiTB může být primární, pokud se vyskytne u pacienta, který předtím nebyl léčený a byl infikován již rezistentním kmenem, anebo sekundární, pokud ji zjistíme nejméně po jednom měsíci léčby antiTB.²

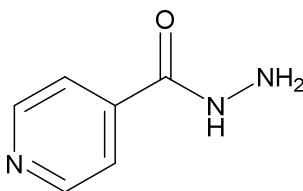
K nejčastějším příčinám nárůstu rezistentních forem patří neadekvátní léčebný režim, nedostatečná edukace pacienta, špatná volba léků, chybné dávkování, přidružené nemoci pacienta, intolerance léčiv, předčasné ukončení léčby, špatná spolupráce pacienta v dodržování pravidelného užívání léků a délky trvání užívání antiTB. Dále pak genetická mutace mykobakterií, migrace obyvatel, neúčinná léčba, selekce a pomnožení rezistentních mutant.^{2,5,16}

Při léčbě rezistentních forem TB se klade důraz na optimální strategii léčby TB, správné používání léčebných režimů, zkušenosti s používáním antiTB druhé řady a zajištění přímo kontrolované léčby nejlépe po celou dobu terapie. Prioritní pro léčbu rezistentních forem jsou antiTB druhé volby: amikacin, kanamycin, kapreomycin, fluorochinolony, ethionamid, prothionamid, cykloserin, terizidon, thiacetazon, paraaminosalicylová kyselina. U všech těchto léčiv je potřeba provádět

testy citlivosti. Doporučuje se aplikovat minimálně 4 antiTB se zjištěnou citlivostí a s co nejvyšší účinností. Zahajovací fáze podávání antiTB je doporučena na dobu 6 měsíců. Celková doba léčby by měla trvat minimálně 18 měsíců. V některých případech lze zařadit i chirurgickou léčbu. Jedná se o doplňující léčbu, které předchází minimálně dvouměsíční léčba. Po operaci pokračuje antituberkulotická terapie do plné délky.^{5,15}

2.2.3 Antituberkulotika první volby

Isoniazid



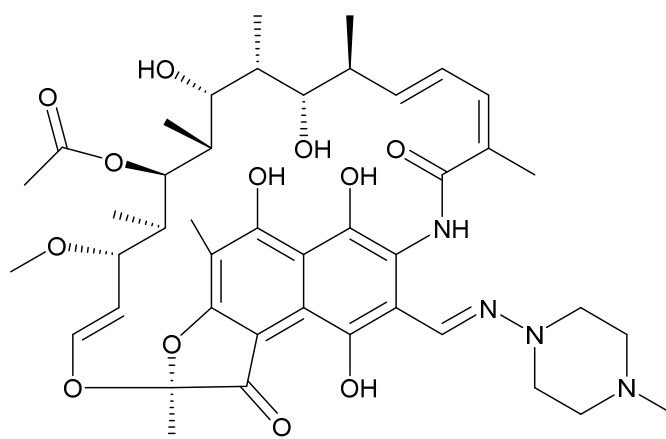
Chemicky se jedná o hydrazid pyridin-4-karboxylové kyseliny (isonikotinové). Je používán jako základní antituberkulotikum již od roku 1952.¹³

Jeho účinek spočívá v selektivním a baktericidním působení na extra- a intracelulární aktivně rostoucí *Mycobacterium tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky. V terapii se používá pouze v kombinaci s ostatními antituberkulotiky, díky poměrně rychle vznikající rezistenci mykobakterií. Pouze při profylaxi lze použít monoterapii isoniazidem.¹⁷

Isoniazid působí tak, že vstupuje do mykobateriální buňky pasivní difúzí jako proléčivo. Je aktivován katalasou-peroxidasou na kyselnu isonikotinovou, které její negativní náboj umožňuje kumulaci uvnitř buňky. Stejný enzym váže kyselinu isonikotinovou na NAD. Tento komplex inhibuje syntézu mastných kyselin navázáním na inhA – enoyl-acyl protein reduktasu a následně dojde k zastavení syntézy kyseliny mykolové. Na biosyntéze mastných kyselin se podílejí dva enzymy a to právě enoyl-acyl protein reduktasa (inhA) a β -ketoacylCoA-acyl protein syntasa (Kasa). Tyto enzymy jsou považovány za cíle aktivovaného inhibitoru. V důsledku těchto dějů pak dochází k poškození buněčné stěny.^{18,19,20}

Jeho indikací je plicní i mimoplicní tuberkulóza a profylaxe plicní tuberkulózy u imunodeficientních pacientů. Jedná se o léčivo vysoce hepatotoxické a neurotoxické, výskyt nežádoucích účinků stoupá s jeho dávkou.²¹ Isoniazid vede k deficitu pyridoxinu, pravděpodobně na základě jejich strukturální podobnosti. Proto preventivní podávání právě pyridoxinu snižuje neurotoxicitu isoniazidu.^{17,22,23,24,25}

Rifampicin



Toto léčivo bylo uvedeno na trh v roce 1952, přesto je dodnes lékem volby v terapii mykobakteriálních infekcí. Rifampicin řadíme mezi ansamycinová antibiotika.¹³

Rifampicin je semisyntetické baktericidní antibiotikum produkované *Streptomyces mediterranei* se širokým antibakteriálním spektrem. Působí proti většině gram-pozitivních a gram-negativních organismů (včetně *Pseudomonas aeruginosa*) a specificky proti *Mycobacterium tuberculosis*.²⁶

V citlivých organismech inhibuje DNA-dependentní RNA-polymerázu bakterií a tím dochází k inhibici syntézy bakteriálních nukleových kyselin. Vzhledem k rychlému vývoji rezistentních bakterií je použití omezeno na léčbu mykobakteriálních infekcí a několik dalších indikací a to vždy v kombinaci s jinými látkami.^{17,26}

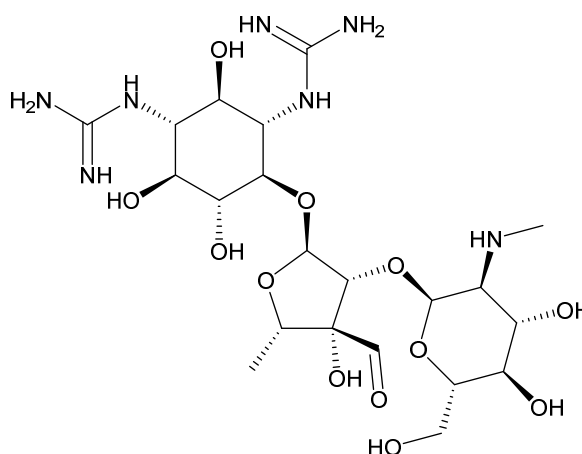
Rifampicin je dobře absorbován při orálním podání a je široce distribuován v tělesných tkáních a tekutinách, včetně cerebrospinální tekutiny. Je metabolizován v

játrech, vylučuje se žlučí, v mnohem menší míře močí. Biologický poločas je 2-5 hodin, při jaterní insuficienci se prodlužuje.²⁶

Při léčbě rifampicinem může docházet k produkci načervenalé zbarvené moči, slz, slin a hlenu. Z nežádoucích účinků jsou významné lehké poruchy jaterních funkcí, kožní vyrážky, gastrointestinální potíže, flu-like syndrom a trombocytopenie.^{21,27}

Rifampicin je induktorem jaterních enzymů a může zvýšit požadavky na dávkování léků metabolizovaných v játrech, např. kortikosteroidů, antikoncepce, perorálních antidiabetik, perorálních antikoagulancií, fenytoinu, cimetidinu, chinidinu, cyklosporinu a srdečních glykosidů.^{27,28,29}

Streptomycin



Jedná se o aminoglykosidové antibiotikum, které bylo zavedeno do praxe roku 1944 a stále se používá. Je produkován mikroorganismy *Streptomyces griseus*. Ve své molekule obsahuje dvě silně bazické guanidinové skupiny a slaběji bazické methylaminoskupiny a díky tomu je poměrně silná trojsytná báze. Používá se ve formě síranu, který je velmi dobře rozpustný ve vodě.¹³

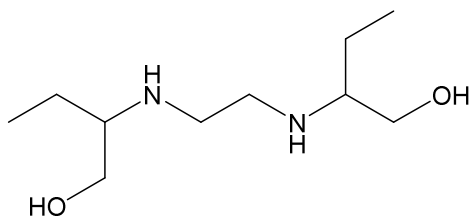
Streptomycin není absorbován z gastrointestinálního traktu, ale po intramuskulární aplikaci rychle difunduje do extracelulárních prostor většiny tkání těla a dosahuje baktericidní koncentrace. Plazmatický poločas, který je normálně 2-3 hodiny, je značně rozšířen u novorozenců, u starších pacientů a u pacientů se

závažným poškozením ledvin. Je vylučován v nezměněné formě močí. Streptomycin musí být podáván hluboko intramuskulárně.³⁰

Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30S. Klinicky významné antimikrobní spektrum streptomycinu zahrnuje především *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella spp.*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas mallei*, *Listeria monocytogenes*, *Streptobacillus moniliformis*, *Spirillum minus*.¹⁷

Z nežádoucích účinků jsou běžné hypersenzitivní reakce, které mohou být i závažné. Při užívání doporučených dávek streptomycinu není obvyklé poškození vestibulární funkce. Ovšem dávka by měla být snížena, pokud se objeví bolesti hlavy, zvracení, závratě či hučení v uších. Streptomycin je méně nefrotoxický než ostatní aminoglykosidová antibiotika. Mezi vzácné nežádoucí účinky patří hemolytická anémie, aplastická anémie, agranulocytóza, trombocytopenie a lupoidní reakce.³⁰

Ethambutol



Jedná se o derivát ethylendiaminu, který je opticky aktivní sloučeninou typu aminoalkoholu se dvěma izolovanými chirálními atomy uhlíku. Účinný je jen pravotočivý *S,S*-(+)-izomer, levotočivý izomer je inaktivní a jeho další stereoizomery jsou toxické, např. *R,R*-izomer způsobuje slepotu.¹³

Ethambutol je bakteriostatické chemoterapeutikum s velmi úzkým antibakteriálním spektrem, které zahrnuje *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*. Jeho indikací je plicní a mimoplicní tuberkulóza (v kombinaci s dalšími antituberkulotiky), *Mycobacterium avium* komplex u HIV pozitivních pacientů.²²

Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy metabolitů mykobakterií a tím poškozují jejich metabolismus. Jeho účinek je omezen pouze na aktivně rostoucí kmeny mykobakterií, zejména *M. tbc*. Snadno se absorbuje z gastrointestinálního traktu. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 2-4 hodiny. Vylučuje se močí, jak v nezměněné formě, tak i jako neaktivní metabolity. Asi 20 % se vylučuje stolicí v nezměněné formě.^{17,31}

Z nežádoucích účinků ethambutolu je nejzávažnější retrobulbární neuritida s poruchou vnímání červené a zelené barvy, zhoršení zrakové ostrosti. Tyto změny jsou reverzibilní, pokud dojde k přerušení léčby, v opačném případě může hrozit až slepota. Z dalších nežádoucích účinků jsou méně časté nechutenství, nauzea, zvracení, periferní neuropatie, hyperurikémie až dnový záchvat. Neurotoxicitu ethambutolu zhoršují ostatní neurotoxická léčiva.^{17,22,31,32,33}

Pyrazinamid

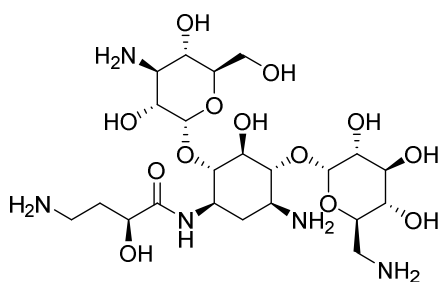
Vzhledem k významnosti tohoto léčiva v této práci, je PZA věnována celá kapitola 2.3

2.2.4 Antituberkulotika druhé volby

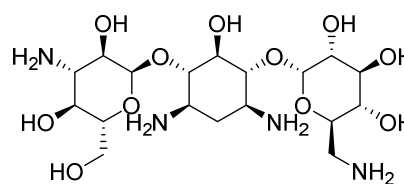
Aminoglykosidová antibiotika

Chemickou strukturou se jedná o trisacharidy až tetrasacharidy, které ve své molekule obsahují neobvyklé aminosacharidy, typické pro tato antibiotika. Všechny obsahují nejméně jeden aminocukr, v centru molekuly aminocyklitol a také obsahují i jeden neutrální cukr. Díky tomu, že obsahují vysoce polární aminoskupiny či jiné bazické skupiny, jsou velmi polární bazické sloučeniny. Vlivem vysoké polaritativy a bazicity se po perorálním podání prakticky nevstřebávají, proto při léčbě systémových infekcí je nutná nitrosvalová nebo nitrožilní infuze. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin, která vzniká zásahem na různých místech ribozomu.^{13,17}

Aminoglykosidy jsou skupina baktericidních antibiotik se spektrem téměř všech gramnegativních mikroorganismů, původně získaných z různých druhů streptomycet. Patří mezi nejstarší antibiotika, u nás jsou však stále poměrně široce používána nemocniční antibiotika. Širšímu užívání aminoglykosidů brání jejich nefrotoxicita a ototoxicita. K léčbě tuberkulózy se používá streptomycin (někdy řazen k první linii antiTB), amikacin, kanamycin.^{17,34}



amikacin



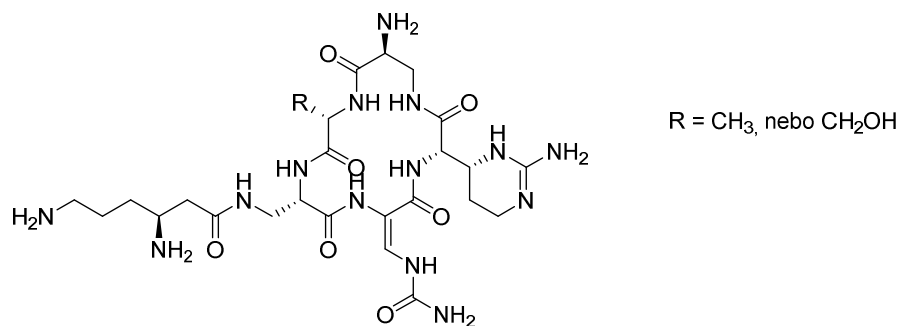
kanamycin

Polypeptidová antibiotika

Patří mezi jedny z neúčinnějších antibiotik, jejich praktické použití je však limitované řadou nežádoucích účinků, především nefrotoxicitou. Polypeptidová antibiotika jsou obvykle směsí několika chemických individuál, izolovaných původně

z jednoho zdroje. Většinou jsou to cyklické peptidy často obsahující aminokyseliny *D*-řady a jiné neobvyklé aminokyseliny. Dále obsahují diaminokyseliny a rovněž jsou součástí jejich struktury neaminokyselinové stavební jednotky jako heterocykly, organické kyseliny a sacharidy. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů.^{13,34}

Jako antiTB druhé volby se ze skupiny polypeptidových antibiotik používá kapreomycin. Je to důležité parenterální léčivo pro léčbu rezistentní TB. Kapreomycin je nefrotoxický a ototoxický, může se objevit tinnitus, hluchota a vestibulární poruchy. Injekce vyvolává lokální bolestivost a mohou se vyskytnout i sterilní abscesy.³⁴



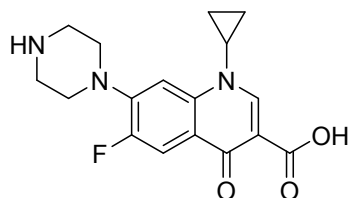
Fluorochinolony

Jedná se o deriváty 1,4-dihydro-4-oxochinolin-3-karboxylové kyseliny, resp. jejich cyklických azaanalogů. Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální topoisomerasy II (DNA-gyrasy) a bakteriální topoisomerasy IV, tj. ATP-dependentních enzymů zodpovědných za správné zřetězení a rozřetězení bakteriální DNA během replikace dceřiných chromosomů. Jsou účinné proti různým grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Jsou účinné při atypické pneumonii a působí na intracelulární patogeny, jako např. některé druhy legionel a na některé mykobakterie, např. *M. tuberculosis*, a na skupinu *M. avium*.^{13,34}

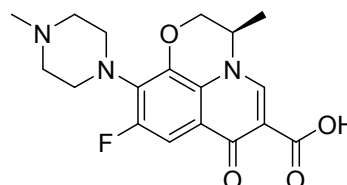
Fluorochinolony jsou obecně dobře snášeny a běžné nežádoucí účinky se vyskytují u 2-8 % nemocných, nejčastějším nežádoucím účinkem jsou gastrointestinální potíže v podobě nauzey, bolesti břicha, zvracení či nechutí k jídlu. Fluorochinolony jsou obecně kontraindikovány u dětí, těhotných a kojících žen.

Výjimkou je použití u dětí s cystickou fibrózou a v život ohrožujících stavech, kdy přínos převáží riziko – ohrožení vývoje chrupavek.^{17,34}

Účinek na *M. tuberculosis* vykazují ciprofloxacin a levofloxacin. Fluorochinolony představují důležitý přínos v léčbě tuberkulózy, zejména proti kmenům rezistentním vůči antituberkulotikům první volby. Rezistence se vyvíjí rychle, pokud se fluorochinolon použije v monoterapii. Proto se užívají v kombinaci se dvěma nebo více dalšími účinnými léčivy. Fluorochinolon v kombinaci s pyrazinamidem se mohou použít také k prevenci onemocnění po styku s aktivní mnohonásobně rezistentní tuberkulózou.^{34,35,36}



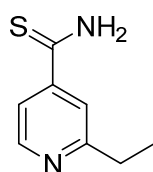
ciprofloxacin



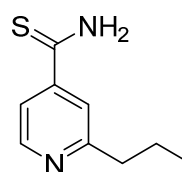
levofloxacin

Thioamidy isonikotinové kyseliny

Do této skupiny řadíme ethionamid a prothionamid, jedná se o relativně toxická bakteriostatická antituberkulotika. Jejich mechanismus účinku spočívá v poškození syntézy kyseliny mykolové. V monoterapii jsou nevhodné vzhledem k rychlému vzniku rezistence a významné toxicitě. Může se vyskytovat zkřížená rezistence mírného stupně mezi isoniazidem a ethionamidem. Mají omezený význam při léčbě plicní a mimoplicní tuberkulózy, kde se podávají vždy v kombinaci s jinými antiTB. Ethionamid se používá v případě rezistence na antiTB první volby a také v terapii proti *Mycobacterium avium* komplexu u pacientů se syndromem získané imunodeficience v případě rezistence na léčiva první volby. Ethionamid vyvolává intenzivní podráždění žaludku a často i neurologické příznaky, je také hepatotoxický.^{13,34}



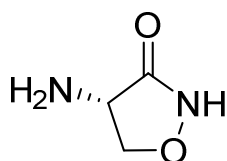
ethionamid



prothionamid

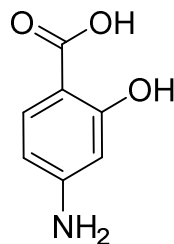
Cykloserin

Cykloserin je širokospektré antibiotikum, derivát isoxazolidonu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny citlivých grampozitivních a gramnegativních bakterií a *M. tbc*. Nejvýznamnější toxické účinky jsou periferní neuropatie a dysfunkce centrálního nervového systému včetně depresí a psychotických reakcí. Neurotoxicita se snižuje současným podáním pyridoxinu.^{17,34}



Para-aminosalicylová kyselina

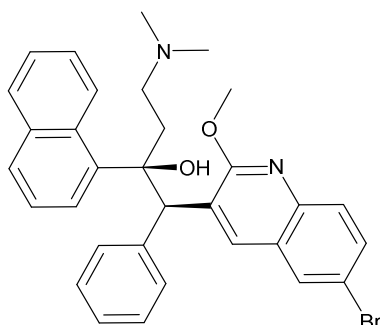
Jedná se o jedno z nejstarších antituberkulotik s velmi jednoduchou strukturou. Mechanismus účinku ale stále není zcela objasněn. Kyselina *para*-aminosalicylová pravděpodobně působí jako alternativní substrát pro metabolismus folátů v *M. tbc*. Tato teorie vychází ze strukturální podobnosti mezi kyselinou *para*-aminosalicylovou a kyselinou *para*-aminobenzoovou, což by mohlo vést k inhibici dihydropteroat synthasy v biosyntetické dráze syntézy folátů. Tato spekulace je založena na dobře prostudovaných mechanismech působení sulfonamidů, jiné skupiny strukturálních analogů kyseliny *para*-aminobenzoové.³⁷ Působí téměř výhradně na *M. tbc*. Dříve patřila mezi antituberkulotika první řady, dnes se již téměř nepoužívá. Nevýhodou byl vznik rezistence a podávání velmi vysokých dávek. Plné dávky *para*-aminosalicylové kyseliny provázejí gastrointestinální potíže, jako je anorexie, nauzea, průjem a bolest v nadbřišku. Může se objevit peptický vřed a krvácení. Často se za 3-8 týdnů terapie objeví reakce přecitlivělosti s horečkou, bolestmi kloubů, vyrážkami, hepatosplenomegálií, hepatitidou, adenopatií a granulocytopenií.^{13,34,38}



2.2.5 Nově zavedená léčiva

Pro vývoj nových potencionálních antimykobakteriálně účinných léčiv existují přísně definovaná kritéria. Samozřejmostí je bezpečnost léčiva. Dále je snaha zkracovat dobu léčby, proto musí být léčivo účinnější než stávající látky. Léčivo by mělo zasahovat nové cíle, aby bylo možno léčit i MDR-TB a XDR-TB. Léčivo musí být kompatibilní s antiretrovirální terapií, protože mnoho pacientů je koinfikováno HIV, a nesmí vykazovat antagonistické působení vůči jiným antiTB.³⁹

Bedachilin

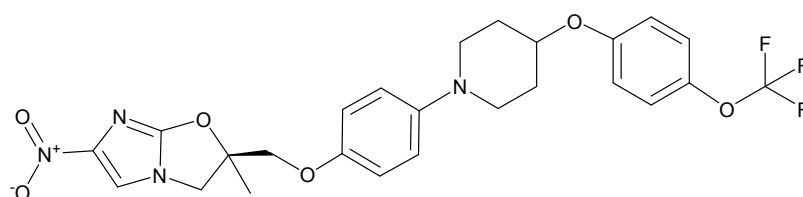


Jedná se o nově schválený lék, strukturně jde o diarylchinolin, označovaný ve studiích také jako TMC207. Bedachilin je považován za první sloučeninu nové třídy velmi účinných léčiv proti TB. Vykazuje velmi nízkou minimální inhibiční koncentraci (MIC) v rozsahu od 0,030 do 0,120 $\mu\text{g/ml}$ vůči kmenu *M. tbc* H37Rv. Vykazuje vysokou baktericidní aktivitu jak v použití samostatně, tak v kombinaci se standardními antiTB první linie. Léčba bedachilinem po dobu 6 měsíců v kombinaci se standardním režimem prokázala vysokou účinnost a bezpečnost.^{40,41,42}

Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici c podjednotky ATP synthasy, která je lokalizovaná v membráně mykobakteriální buňky. Dále zastavuje energetické procesy a inhibuje reprodukci mykobakterií, což má za následek jejich smrt. Bedachilin s vysokou specifitou zasahuje protonovou pumpu, potřebnou k syntéze ATP. Lidská ATP synthasa je 20 000 x méně citlivá na bedachilin. Syntéza de novo ATP je nezbytná pro životaschopnost nereplikujících se mykobakterií. Bedachilin vykazuje aktivitu proti oběma formám mykobakterií, tedy replikujícím se i spícím mykobakteriím.^{41,42}

Bedachilin je vysoce účinný proti citlivým i rezistentním formám TB. FDA proto povolila zrychlené schválení bedachilinu k léčbě MDR-TB u dospělých i přes závažné obavy o jeho bezpečnost. Mezi ně patří vysoká úmrtnost, arytmie, kumulace ve tkáních a zvýšená hladina transaminas. Mezi další nežádoucí účinky patří anorexie, bolest kloubů, bolest na hrudi, bolesti hlavy, hemoptýza, zvýšení amylasy, existuje také riziko prodloužení QT intervalu, které je třeba monitorovat. Bedachilin je metabolizován cytochromem CYP 3A4, proto se musí dbát na jeho interakce.⁴⁰⁻⁴³

Delamanid



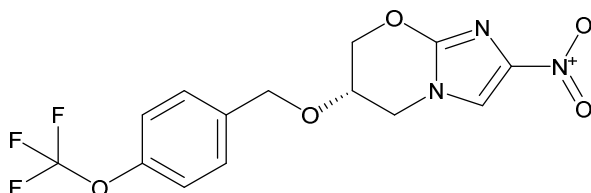
Je léčivo struktury nitroimidazolu-oxazolu, ve studiích označován jako OPC-67683. Jedná se o orálně podávaný prekurzor, jehož metabolity působí na mykobakteriální buněčné stěny, kde blokuji syntézu kyselin methoxy-mykolových a keto-mykolových. Nitroimidazoly zabíjejí bakterie TB produkcí oxidu dusnatého, který vzniká při metabolizaci léčiv této struktury.⁴⁴ Vykazuje mimořádně nízké MIC v rozmezí od 0,006 do 0,024 µg/ml in vitro, kde bylo prokázáno, že je 4-64, 2-32, 128-256, 64-512, 8-16 a 4-16 krát nižší než rifampicin, isoniazid, ethambutol, streptomycin, CGI-17341 a pretomanid, v daném pořadí. Jeho výhodou je, že neovlivňuje jaterní enzymy a proto může být použit v kombinaci s antiretrovirálními látkami u pacientů s koinfekcí HIV.^{40,41,44}

Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou poměrně nezávažné, jedná se především o nevolnost, zvracení, závratě, hypokalémii, paresthesi, úzkost a tremor. Ovlivnění QT intervalu v kombinaci s jinými léčivy a podání u dětí, těhotných žen a starších osob je ještě ve fázi klinického zkoušení.⁴⁴

Použití delamanidu WHO doporučuje v případech, kde není možno použít standardní léčebný režim, např. při nesnášenlivosti stávajících léčiv. Dále jej lze použít u pacientů se špatnými výsledky (tj. v pokročilém a rozsáhlém stádiu nemoci).

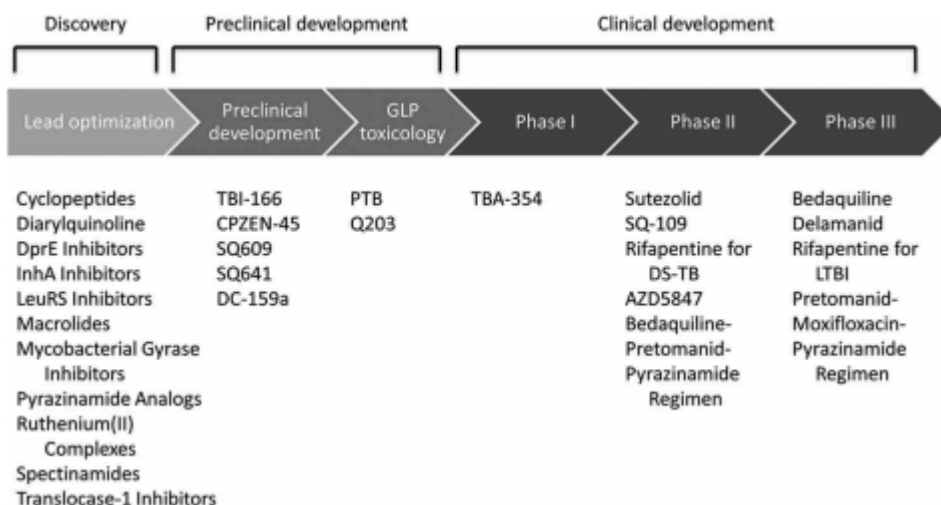
Při době léčby 6 měsíců v kombinaci s optimalizovaným základním režimem prokázal vysokou účinnost a snášenlivost.^{40,44}

Pretomanid

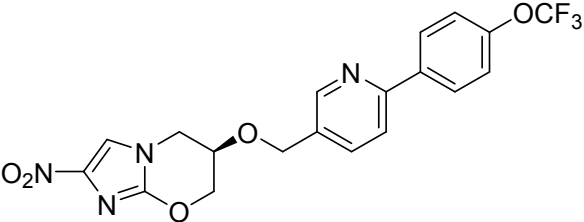
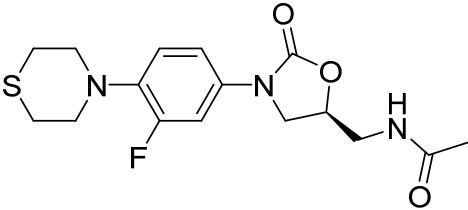
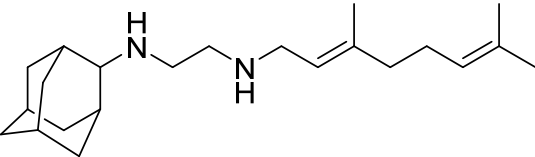
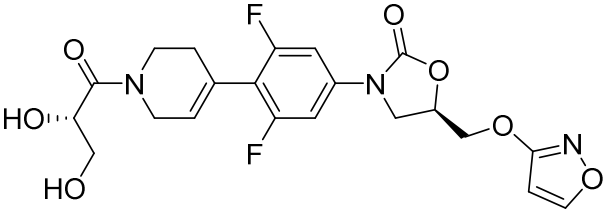


Chemickou strukturou se jedná o látku typu nitroimidazolu, v klinických studiích je označován jako PA-824. Pretomanid vykazuje silnou antimykobakteriální aktivitu, nevykazuje žádné známky mutagenity. Vykazuje nízkou MIC v rozmezí od 0,015 do 0,25 µg/ml, která se podobá isoniazidu. Pretomanid vykazuje baktericidní aktivitu na obě replikační stádia *M. tuberculosis*, inhibuje syntézu komponentů buněčné stěny mykobakterie a ketomykolátu. Mezi časté nežádoucí účinky patří hyperurikémie, nevolnost a zvracení. Prodloužení QT intervalu nebylo pozorováno. Vykazuje interakci s antiretrovirovými léky, ve studiích na zdravých jedincích bylo pozorováno snížení koncentrace pretomanidu v plazmě při současném podávání efavirenzu. Ve standardní sérii studií nebyly prokázány žádné významné interakce cytochromu P450 a žádná významná aktivita proti širokému spektru gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Pretomanid prokázal vysokou účinnost a bezpečnost v kombinaci s moxifloxacinem a pyrazinamidem.⁴⁰

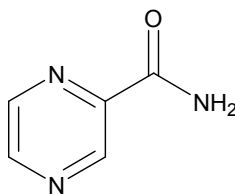
Obrázek 4 Nové léky proti tuberkulóze v současné vývojové linii. Převzato (se svolením) z Expert Opinion on Investigational Drugs⁴⁰



Tabulka 2 Struktury léčiv v klinickém hodnocení

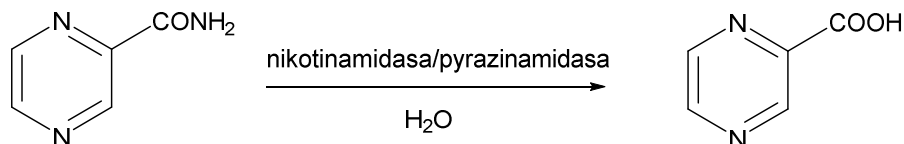
TBA-354 (nitroimidazol)	
Sutezolid (oxazolidinon)	
SQ-109 (derivát ethylenadiaminu)	
AZD5847 (oxazolidinon)	

2.3 Pyrazinamid



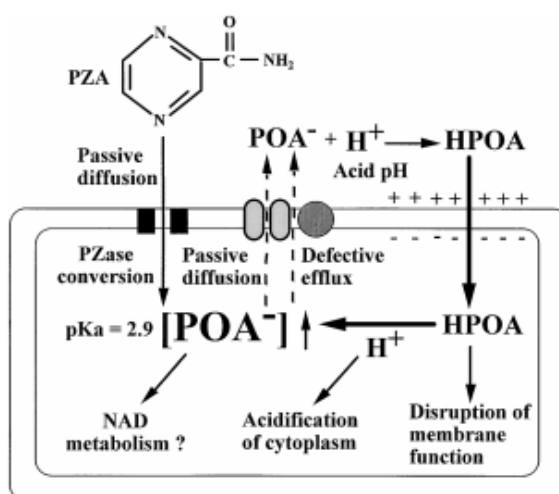
Pyrazinamid (PZA) je léčivo první linie pro léčbu TB. Poprvé byl syntetizován v roce 1936. Jako antituberkulotikum byl poprvé použit v roce 1952. Jedná se o chemoterapeutikum s bakteriostatickým až baktericidním účinkem s velmi úzkým antibakteriálním spektrem (*M. tbc*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium avium*). Působí na intracelulárně uložená mykobakteria. Používá se v kombinaci s isoniazidem, rifampicinem a ethambutolem. Nikdy se nepoužívá samostatně. Často se také používá pro léčbu MDR-TB. Hraje jedinečnou úlohu při zkrácení doby léčby TB. Zkracuje dobu léčby z 9-12 měsíců na 6 měsíců.^{17,22,45}

2.3.1 Mechanismus účinku



PZA je proléčivo, které vstupuje do bakterie pomocí pasivní difúze. Aktivní léčivo vzniká pomocí enzymu nikotinamidasy (pyrazinamidasy) uvnitř tuberkulotické buňky, kde vzniká antimykobakteriálně velmi aktivní pyrazin-2-karboxylová kyselina (POA). Ta je následně efluxem vypuzena z mykobakteria. V kyselém extracelulárním prostředí se kyselina převede na protonizovanou formu a pasivní difúzí se opět dostává do mykobakteriální buňky, kde dojde k uvolnění získaného protonu. Tento cyklus se stále opakuje, což vede k acidifikaci vnitřního prostředí mykobakteria a hromadění POA, dochází tak k inhibici životně důležitých enzymů mykobakteria.^{13,45,46,47}

Obrázek 5 Model mechanismu účinku PZA⁴⁷



PZA působí jako kompetitivní inhibitor vazby kofaktoru NADPH na enzym FAS I (Fatty Acid Synthase I) *M. tbc*, zodpovědného za syntézu mykolových kyselin. POA se také váže na FAS I, i když na jiném místě než PZA a NADPH. Bylo zjištěno, že vazba na FAS I je podstatně silnější u látek odvozených od 5-chlor POA nebo jejich esterů.^{48,49}

Bylo zjištěno, že akumulace POA narušuje membránový potenciál, který je důležitý pro transport mnoha živin a zasahuje tak do výroby energie, která je nezbytná pro přežití *M. tbc*. Dochází tedy k narušení transportní funkce membrány.⁵⁰

POA interaguje s ribozomálním proteinem S1 (RpsA), který je zapojen do trans-translace. Trans-translace je proces, ve kterém dochází k záchraně ribozomů, které se pozastavily v průběhu dekodování mRNA. Klíčovým krokem trans-translace je navázání tmRNA na RpsA. POA po navázání na RpsA blokuje právě vazebné místo pro tmRNA, čímž dochází k zastavení trans-translace. V podmínkách buněčného stresu vyvolaného např. vnějším prostředím (nízké pH, nedostatek živin) vzrůstá počet chyb při translaci a narůstá tak i význam opravného trans-translačního procesu. Bakterie často reagují přechodem do dormantního stavu. Mechanismus účinku PZA založený na inhibici trans-translace tak může dobře vysvětlit známý fakt, že PZA je účinnější v kyselém prostředí a má sterilizující účinky i na dormantní subpopulace *M. tbc*.⁴⁵

Aspartát dekarboxylasa (PanD), převádí *L*-aspartát na β -alanin, který je potřebný pro syntézu pantothenátu (vitamín B5), který je mimo jiné nutný pro syntézu koenzymu A (CoA), což je ústřední molekula veškerého energetického metabolismu a umožňuje, aby byly sacharidy, tuky a proteiny využity jako zdroj energie. POA pravděpodobně inhibuje enzymatickou aktivitu PanD v mykobakteriální buňce.⁵¹

2.3.2 Farmakokinetika PZA

Po perorálním podání se úplně vstřebává. Velmi dobře proniká do tkání a séra, včetně CNS. Vazba na plazmatické bílkoviny je asi 25 %. K jeho biotransformaci na aktivní metabolit POA dochází v játrech. Vylučuje se převážně formou metabolitů močí, částečně pak žlučí. Jeho biologický poločas je 9-12 hodin. U pacientů s těžkou poruchou ledvin se prodlužuje až na 26 hodin.^{17,22}

2.3.3 Nežádoucí účinky

Především se jedná o hepatotoxicitu, která je závislá na podané dávce. Dále se může objevit nauzea, zvracení, bolesti hlavy a žaludku, nespavost, závratě. Méně často pak cholestatický ikterus, vzácně hyperurikémie, akutní záchvat dny, alergické kožní reakce a svědění.^{17,21,22}

2.3.4 Dávkování

Neliší se u dospělých a dětí. V iniciální a pokračovací fázi se podává 15-30 mg/kg (maximálně 2 g) každých 24 hodin. V pokračovací fázi terapie alternativně 30-60 mg/kg (maximálně 3 g) 3 x týdně, nebo 50-70 mg/kg (maximálně 4 g) 2 x týdně. Délka terapie je individuální. V kombinaci s ostatními antituberkulotiky může trvat i několik měsíců.²²

V ČR je dostupný v rámci specifického léčebného programu.

2.4 Mikrovlnná syntéza

2.4.1 Princip

Mikrovlnné záření je elektromagnetické záření, jehož frekvence se pohybuje v rozsahu 300 až 300 000 MHz. Pro vědecké účely je preferována frekvence 2450 MHz. Mikrovlnné záření je tvořeno elektrickým a magnetickým polem, nicméně jen elektrické pole přispívá k ohřevu látky.^{52,53}

Při tradičním ohřívání látky je používán externí zdroj tepla. Teplo se k reakční směsi dostává skrze stěny nádoby. Toto je velmi pomalá a neefektivní metoda přenášení energie do systému, protože závisí na tepelné vodivosti různých materiálů. Ohřev pomocí mikrovlnného záření je odlišný proces. Mikrovlny působí přímo na molekuly, obsažené v reakční směsi, což vede k rychlému nárůstu teploty. Výsledkem je i lokální přehřátí reakční směsi a to buď mechanismem dipólové rotace, nebo iontové vodivosti. Dipólová rotace je interakce, při které se polární molekuly snaží vyrovnat s rychle se měnícím elektrickým polem mikrovln. A právě tento rotační pohyb vede k přenosu energie. Druhou možností přenosu energie je iontové vedení. Jestliže jsou v reakční směsi přítomny volné ionty nebo iontové skupiny, bude docházet k jejich pohybu vlivem elektrického pole. To rovněž způsobí přehřátí, jak již bylo popsáno výše. Teplota látky také ovlivňuje iontovou vodivost, se zvyšující se teplotou se přenos energie se stává účinnějším.^{52,53}

2.4.2 Mikrovlnná syntéza esterů

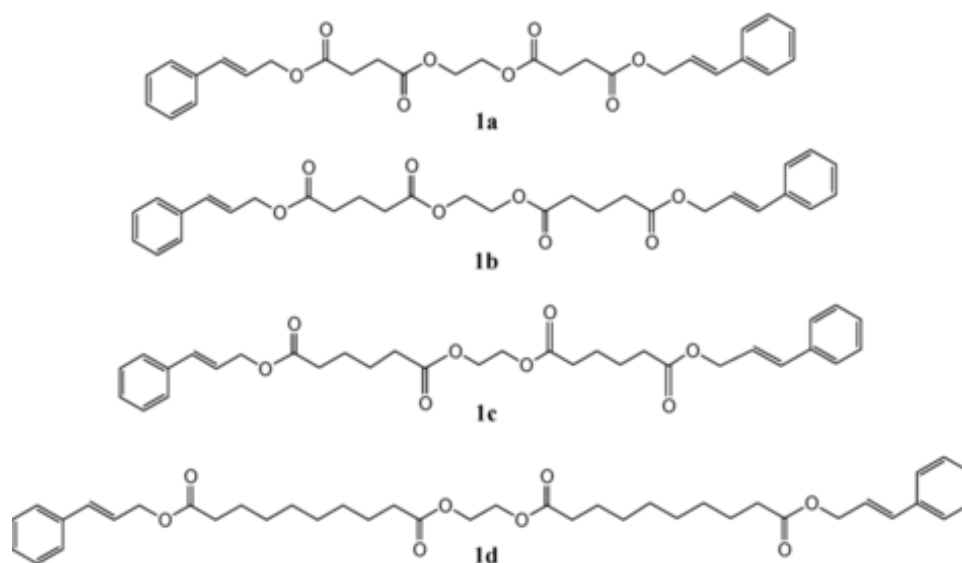
Mnoho syntetických aromatických esterů může být připraveno esterifikací karboxylové kyseliny alkoholem v přítomnosti silné minerální kyseliny, reakcí alkoholu s chloridem kyseliny v prostředí indierentní baze, nebo transesterifikační reakcí. Nicméně tyto reakce často vyžadují velký přebytek jednoho z reaktantů (obvykle alkoholu), použití toxických rozpouštědel a vysokých teplot, aby se dosáhlo dostatečného výtěžku konečného produktu. V mnoha případech může použití silných minerálních kyselin jako katalyzátorů procesu esterifikace způsobit tvorbu

nežádoucích vedlejších produktů. Tento jev znatelně snižuje účinnost syntézy a zvyšuje výrobní náklady.⁵⁴

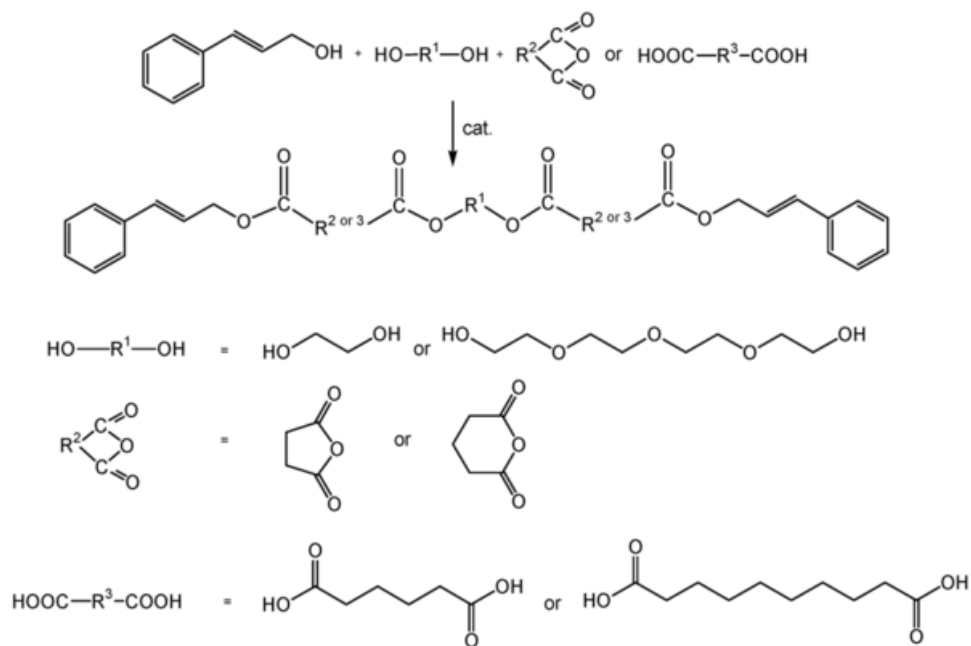
Použití mikrovlnné technologie umožňuje rychlou, hladkou a spolehlivou přípravu nejrůznějších biologicky aktivních molekul. V řadě případů mikrovlnná syntéza vede k dramatickému snížení reakční doby a k přípravě konečných produktů s vysokou čistotou. Pomáhá také při přípravě sloučenin, které je obtížné syntetizovat za použití tradičních způsobů syntézy. Mikrovlnná syntéza se neomezuje jen na výzkum antituberkulotik, ale je dnes široce používán v mnoha oblastech farmaceutické chemie.^{54,55}

Pro porovnání syntézy organických esterů konvenční metodou a s pomocí mikrovlnného záření můžeme uvést jako příklad přípravu esterů kyseliny skořicové s dlouhými řetězci. K mikrovlnné syntéze byl využit mikrovlnný reaktor RM-800 multimode microwave reactor, Plazmatronika, Wrocław, Polsko. V obou typech reakcí probíhá syntéza při teplotě 140 °C bez rozpouštědla. V tabulce 3 je znázorněno porovnání reakčních dob reakcí, kde je zcela patrné, že využití mikrovln významně zkracuje reakční dobu přípravy esterů při stejné výtěžnosti reakce⁵⁴

Obrázek 6 Struktury esterů⁵⁴



Obrázek 7 Reakční schéma⁵⁴



Tabulka 3 Doba a výtěžky reakcí při užití konvenční metody syntézy a mikrovlnné syntézy⁵⁴

Sloučenina	Doba reakce		Výtěžek reakce (%)	
	Konvenční metoda	Mikrovlnná syntéza	Konvenční metoda	Mikrovlnná syntéza
1a	30 h	10 min	90	90
1b	37 h	12 min	91	90
1c	42 h	14 min	91	92
1d	51 h	17 min	92	92

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje a chemikálie

U všech chemikálií, které byly v práci použity, byly ověřeny fyzikální konstanty, rozpouštědla byla před použitím vysušena a vyčištěna obvyklým způsobem.

Čistota látek a kontrola průběhu reakcí byla monitorována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), která byla prováděna na deskách Merck, Silica gel 60 F₂₅₄. Vyvíjecí soustavu pro kyseliny tvořila voda:kyselina octová (99%):butanol v poměru 5:1:4, pro estery propanol:amoniak (20% vodný roztok) 3:1. Detekce byla prováděna pod UV lampou s vlnovou délkou záření 254 nm.

Připravované látky se syntetizovaly v mikrovlnném reaktoru CEM Discover s autosamplerem Explorer 24. Produkty syntézy byly odděleny a přečištěny pomocí preparativního chromatografu CombiFlash® (Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA).

Teploty tání syntetizovaných látek se stanovovaly v otevřené kapiláře pomocí přístroje Stuart Scientific, SMP (Bibby Sterling LTD, UK). Výsledné hodnoty jsou nekorigované.

Elementární analýzy byly provedeny pomocí analyzátoru Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (paní Věnceslava Hronová).

¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla změřena pomocí spektrometru Varian VNMR S500 (Varian Corp., Palo Alto, CA, USA) při frekvenci 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C, na Katedře organické a anorganické chemie (doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.). Spektra byla zaznamenána v DMSO-*d*₆ nebo v deuterovaném CDCl₃ při laboratorní teplotě. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách ppm a jsou nepřímě vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) jako signály rozpouštědla.

Retenční faktor k byl změřen pomocí kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 SL s detektorem diodového pole SL G1315C (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA); s předkolonou ZORBAX XDB-C185 μm , 4×4 mm, Part No. 7995118-504 (Agilent Technologies Inc.) a kolonou ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μm , 4.6×250 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc.) na Katedře biofyziky a fyzikální chemie (Ing. Vladimír Kubíček, CSc.). Separační proces byl kontrolován pomocí Agilent ChemStation, verze B.04.02 rozšířeným o spektrální modul (Agilent Technologies Inc.).

Veškeré vzorce chemických sloučenin a hodnoty vztahující se k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem ($\log P$ a $\text{Clog } P$) byly vytvořeny a vypočteny pomocí programu CS ChemBioDraw Ultra, verze 14.0 (ChambridgeSoft, MA, USA).

3.2 Výchozí látky

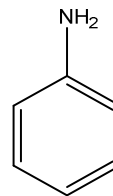
1) anilin

Sumární vzorec: C_6H_7N

M. h.: 93,13 g/mol

log P : 1,23

Clog P : 0,915



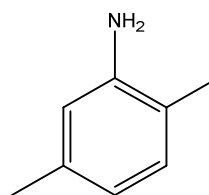
2) 2,5-dimethylanilin

Sumární vzorec: $C_8H_{11}N$

M. h.: 121,18 g/mol

log P : 2,21

Clog P : 1,863



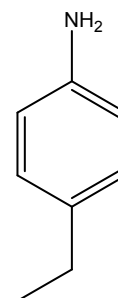
3) 4-ethylanilin

Sumární vzorec: $C_8H_{11}N$

M. h.: 121,18 g/mol

log P : 2,14

Clog P : 1,943



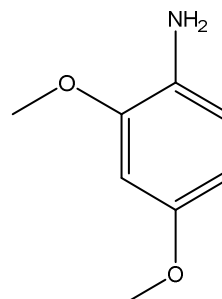
4) 2,4-dimethoxyanilin

Sumární vzorec: $C_8H_{11}NO_2$

M. h.: 153,18 g/mol

log P : 0,98

Clog P : 1,2135



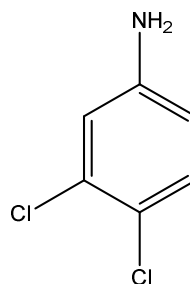
5) 3,4-dichloranilin

Sumární vzorec: $C_6H_5Cl_2N$

M. h.: 162,01 g/mol

$\log P$: 2,35

$\text{Clog } P$: 2,599



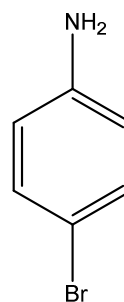
6) 4-bromanilin

Sumární vzorec: C_6H_6BrN

M. h.: 172,03 g/mol

$\log P$: 2,06

$\text{Clog } P$: 2,058



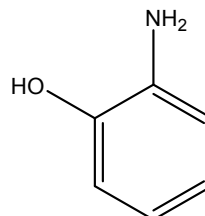
7) 2-aminofenol

Sumární vzorec: C_6H_7NO

M. h.: 109,13 g/mol

$\log P$: 0,84

$\text{Clog } P$: 0,618



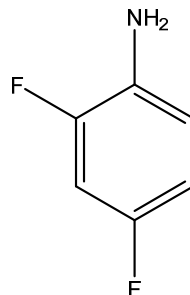
8) 2,4-difluoranilin

Sumární vzorec: $C_6H_5F_2N$

M. h.: 129,11 g/mol

$\log P$: 1,55

$\text{Clog } P$: 1,499



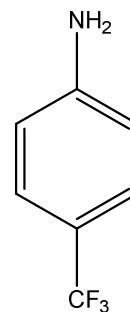
9) 4-(trifluormethyl)anilin

Sumární vzorec: $C_7H_6F_3N$

M. h.: 161,13 g/mol

log *P*: 2,15

Clog *P*: 2,288



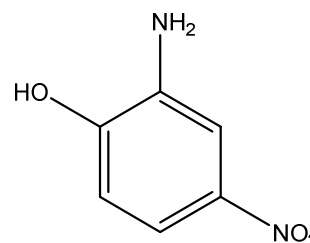
10) 2-amino-4-nitrofenol

Sumární vzorec: $C_6H_6N_2O_3$

M. h.: 154,13 g/mol

log *P*: 0,62

Clog *P*: 1,177



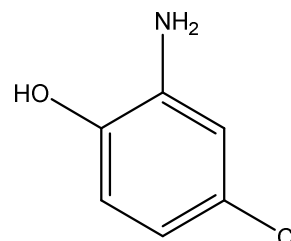
11) 2-amino-4-chlorfenol

Sumární vzorec: C_6H_6ClNO

M. h.: 143,57 g/mol

log *P*: 1,4

Clog *P*: 1,7118



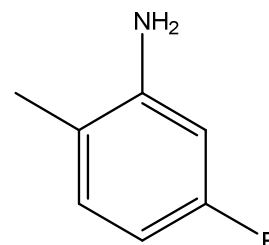
12) 5-fluor-2-methylanilin

Sumární vzorec: C_7H_8FN

M. h.: 125,15 g/mol

log *P*: 1,88

Clog *P*: 1,787



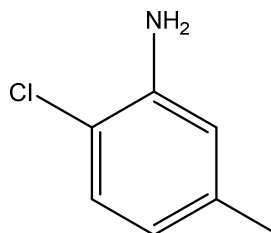
13) 2-chlor-5-methylanilin

Sumární vzorec: C_7H_8ClN

M. h.: 141,60 g/mol

log P : 2,28

Clog P : 2,407



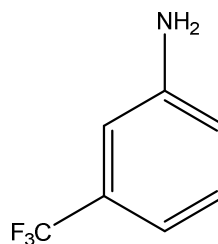
14) 3-(trifluormethyl)anilin

Sumární vzorec: $C_7H_6F_3N$

M. h.: 161,13 g/mol

log P : 2,15

Clog P : 2,288



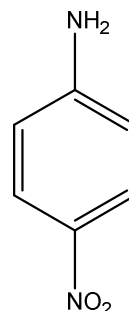
15) 4-nitroanilin

Sumární vzorec: $C_6H_6N_2O_2$

M. h.: 138,13 g/mol

log P : 1,01

Clog P : 1,258



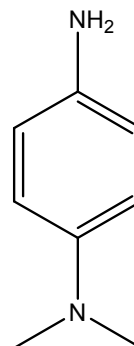
16) *N,N*-dimethylbenzyl-1,4-diamin

Sumární vzorec: $C_8H_{12}N_2$

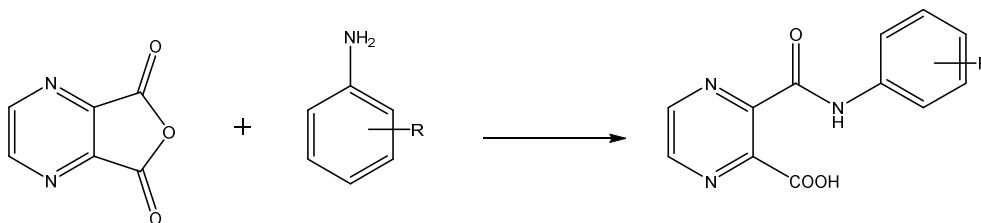
M. h.: 136,20 g/mol

log P : 1,52

Clog P : 1,08



3.3 Postup přípravy derivátů 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny

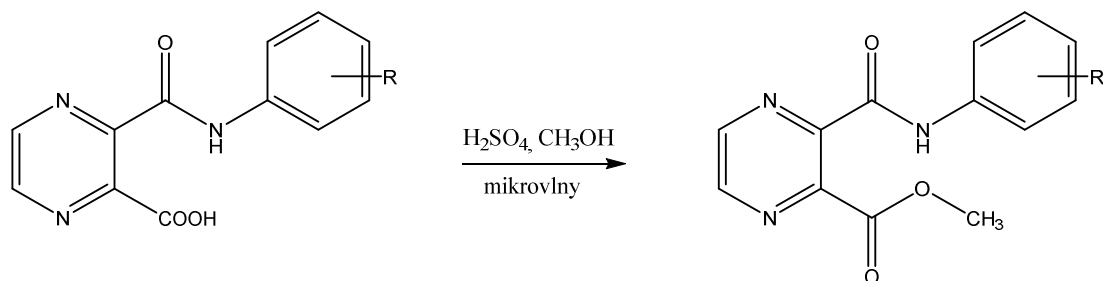


Reakce byla prováděna dle dříve publikovaného postupu.⁵⁶

V Erlenmayerově baňce jsem rozpustila 1g (6,7 mmol) anhydridu kyseliny pyrazin-2,3-dikarboxylové ve 40 ml tetrahydrofuranu (THF). K tomuto roztoku jsem v jedné dávce přidala příslušný anilin (6,7 mmol). Tuto směs, opatřenou magnetickým míchadlem jsem nechala 1 hodinu míchat na magnetické míchačce za laboratorní teploty. Průběh reakce jsem kontrolovala pomocí TLC v soustavě voda:kyselina octová:butanol 5:1:4. Poté jsem ke směsi přidala 30 ml vody. Dále jsem postupně přidávala hydrogenuhličitan sodný, dokud nebylo pH roztoku rovno 6. Vysrážený produkt se odfiltroval, promyl vodou a nechal se vysušit v exsikátoru.

Pokud nedošlo k vysrážení produktu, reakční směs se vytřepávala ethylacetátem. Spojené organické vrstvy se vysušily bezvodým Na₂SO₄ a rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce za sníženého tlaku. V případě potřeby se produkt rekrystalizoval z ethanolu.

3.4 Postup přípravy esterů 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Do silnostěnné zkumavky určené pro mikrovlnnou syntézu jsem navázila 250 mg substituované 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Výchozí kyselinu jsem rozpustila ve 2-3 ml (nadbytek) methanolu a přidala 1-2 kapky H_2SO_4 . Do zkumavky jsem přidala míchadlo a uzavřela gumovým víčkem. Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru po dobu 20 minut při teplotě $120\text{ }^\circ\text{C}$ a výkonu 50W. Průběh reakce byl po skončení reakce zkontrolován pomocí TLC v soustavě propanol:amoniak 3:1. Reakční směs byla naadsorbována na silikagel, vysušena na vakuové odparce a rozdělena pomocí preparativního chromatografu. Jako mobilní fáze byla použita směs hexanu a ethylacetátu, produkt byl eluován gradientovou separací v rozmezí 50-100 % ethylacetátu v hexanu. Výsledný produkt byl vysušen a odeslán k následným analýzám a testům.

3.5 Nově připravené sloučeniny

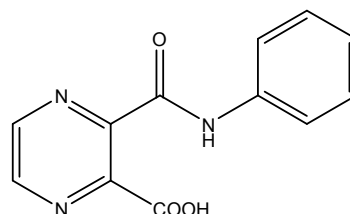
3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylová kyselina⁵⁷

Označení: LSVL2 **Sumární vzorec:** C₁₂H₉N₃O₃ **M.h.:** 243,22 g/mol

log P: 0,57 **Clog P:** 0,7287 **log k:** -1,6214

Teplota tání: 163,1-164,6 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka



Výtěžnost reakce:

1,4667 g (90,5 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 59,26 %; H 3,73 %; N 17,28 %; O 19,73 %

zjištěná: C 59,34 %; H 3,61 %; N 17,24 %

R (ATR-Ge, cm⁻¹): 3341 (N-H, CONH), 3051 (O-H, COOH), 1712 (C=O, COOH), 1682 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.77 (bs, 1H, COOH), 10.75 (s, 1H, NH), 8.92 – 8.86 (m, 2H, pyrazin), 7.80 – 7.75 (m, 2H, Ar), 7.40 – 7.34 (m, 2H, Ar), 7.16 – 7.11 (m, 1H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.45, 162.61, 146.40, 145.85, 145.80, 144.69, 138.57, 128.98, 124.39, 120.25.

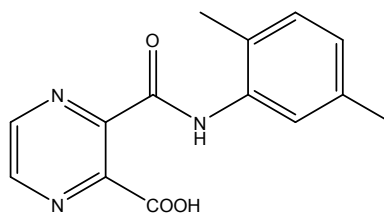
3-[(2,5-dimethylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ1 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₃N₃O₃ **M.h.:** 271,28 g/mol

log P: 1,54 **Clog P:** 1,0766 **log k:** -1,4323

Teplota tání: 177,4-178,8 °C

Vzhled: šedá krystalická látka



Výtěžnost reakce:

1,4645 g (81,0 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 61,99 %; H 4,83 %; N 15,49 %; O 17,69 %

zjištěná: C 62,46 %; H 4,73 %; N 15,53 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3339 (N-H, CONH), 2918 (O-H, COOH), 1687 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.75 (bs, 1H, COOH), 10.15 (s, 1H, NH), 8.91 – 8.87 (m, 2H, pyrazin), 7.40 – 7.38 (m, 1H, Ar), 7.14 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 6.99 – 6.95 (m, 1H, Ar), 2.28 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.53, 162.37, 146.50, 145.90, 145.30, 144.69, 135.48, 135.36, 130.39, 129.06, 126.63, 125.43, 20.80, 17.39.

3-[(4-ethylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ2 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₃N₃O₃ **M.h.:** 271,28 g/mol

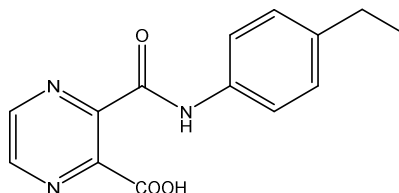
log P: 1,47 **Clog P:** 1,7567 **log k:** -1,4586

Teplota tání: 159,1-159,9 °C

Vzhled: běžová krystalická látka

Výtěžnost reakce:

1,7857 g (98,8 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 61,99 %; H 4,83 %; N 15,49 %; O 17,69 %

zjištěná: C 58,07 %; H 5,24 %; N 14,57 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3314 (N-H, CONH), 2972 (O-H, COOH), 1704 (C=O, COOH), 1664 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.68 (s, 1H, NH), 8.90 – 8.86 (m, 2H, pyrazin), 7.71 – 7.65 (m, 2H, Ar), 7.23 – 7.16 (m, 2H, Ar), 2.58 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.50, 162.32, 146.52, 145.79, 145.67, 144.60, 139.87, 136.24, 128.16, 120.32, 27.85, 15.88.

3-[(2,4-dimethoxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ3 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₃N₃O₅ **M.h.:** 303,27 g/mol

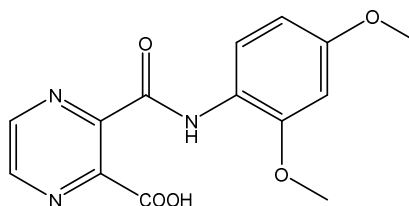
log P: 0,32 **Clog P:** 0,0367 **log k:** -1,5488

Teplota tání: 199,6-200,3 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

1,7134 g (84,8 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 55,45 %; H 4,32 %; N 13,86 %; O 26,38 %

zjištěná: C 55,46 %; H 4,31 %; N 13,84 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3309 (N-H, CONH), 3129 (O-H, COOH), 1741 (C=O, COOH), 1667 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.73 (bs, 1H, COOH), 9.95 (s, 1H, NH), 8.91 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 6.70 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar), 6.58 – 6.55 (m, 1H, Ar), 3.89 (s, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.87, 160.06, 157.18, 150.63, 147.69, 146.60, 144.22, 142.07, 121.24, 119.89, 104.50, 99.14, 56.27, 55.56.

3-[(3,4-dichlorfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ4 **Sumární vzorec:** C₁₂H₇Cl₂N₃O₃ **M.h.:** 312,11 g/mol

log P: 1,69 **Clog P:** 2,0525 **log k:** -1,3840

Teplota tání: 290,0-292,1 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

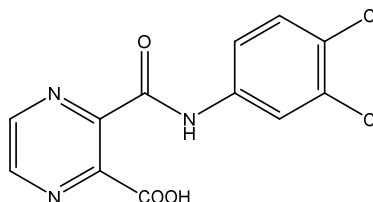
Výtěžnost reakce:

1,7673 g (85,0 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 46,18 %; H 2,26 %; Cl 22,72 %; N 13,46 %, O 15,38 %

zjištěná: C 46,18 %; H 2,24 %; N 13,32 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3274 (N-H, CONH), 2898 (O-H, COOH), 1724 (C=O, COOH), 1671 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 11.10 (s, 1H, NH), 8.92 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar), 7.77 – 7.71 (m, 1H, Ar), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.35, 162.94, 146.51, 146.23, 145.03, 144.76, 138.65, 131.26, 130.96, 126.00, 121.49, 120.37.

3-[(4-bromfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ5 **Sumární vzorec:** C₁₂H₈BrN₃O₃ **M.h.:** 322,12 g/mol

log P: 1,4 **Clog P:** 1,6049 **log k:** -1,4586

Teplota tání: 171,1-171,9 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

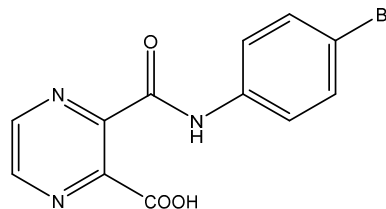
Výtěžnost reakce:

1,8051 g (84,1 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 44,75 %; H 2,50 %; Br 24,81 %; N 13,05 %; O 14,90 %

zjištěná: C 39,35 %; H 2,62 %; N 11,55 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3312 (N-H, CONH), 2973 (O-H, COOH), 1706 (C=O, COOH), 1662 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.92 (s, 1H, NH), 8.92 – 8.86 (m, 2H, pyrazin), 7.80 – 7.72 (m, 2H, Ar), 7.59 – 7.52 (m, 2H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.39, 162.75, 146.43, 145.98, 145.55, 144.71, 137.96, 131.82, 122.20, 116.16.

3-[(2-hydroxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ6 **Sumární vzorec:** C₁₂H₉N₃O₄ **M.h.:** 259,22 g/mol
log P: 0,18 **Clog P:** 0,2917 **log k:** -1,6628

Teplota tání: 266,4-269,5 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

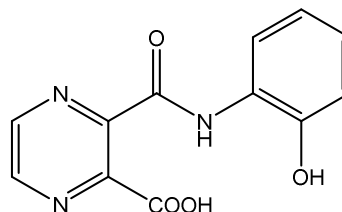
Výtěžnost reakce:

1,6394 g (94,9 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 55,60 %; H 3,50 %; N 16,21 %; O 24,69 %

zjištěná: C 55,77 %; H 3,39 %; N 16,07 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3278 (O-H, OH), 3106 (N-H, CONH), 2854 (O-H, COOH), 1713 (C=O, COOH), 1611 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.74 (bs, 1H, COOH), 10.31 (s, 1H, OH), 10.15 (s, 1H, NH), 8.93 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.24 – 8.20 (m, 1H, Ar), 7.03 – 6.93 (m, 2H, Ar), 6.88 – 6.83 (m, 1H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.92, 160.10, 147.86, 147.12, 146.85, 144.27, 141.64, 125.81, 125.03, 119.93, 119.48, 115.13.

3-[(2,4-difluorfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ7 **Sumární vzorec:** C₁₂H₇F₂N₃O₃ **M.h.:** 279,20 g/mol
log P: 0,89 **Clog P:** 0,4325 **log k:** -1,5166

Teplota tání: 187,0-188,0 °C

Vzhled: šedá krystalická látka

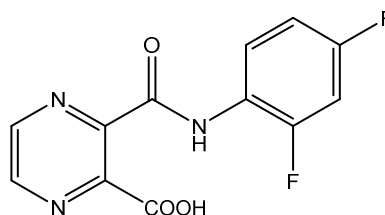
Výtěžnost reakce:

1,7496 g (94,1 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 51,62 %; H 2,53 %; F 13,61 %; N 15,05 %; O 17,19 %

zjištěná: C 51,41 %; H 2,05 %; N 14,72 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3346 (N-H, CONH), 2906 (O-H, COOH), 1702 (C=O, COOH), 1654 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.79 (bs, 1H, COOH), 10.54 (s, 1H, NH), 8.91 (d, 1H, *J*=2.7 Hz, pyrazin), 8.89 (d, 1H, *J*=2.7 Hz, pyrazin), 7.86-7.79 (m, 1H, Ar), 7.42-7.35 (m, 1H, Ar), 7.17-7.12 (m, 1H, Ar); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 165.4, 162.7, 159.5 (dd, *J*=245.1 Hz, *J*=11.4 Hz), 155.1 (dd, *J*=249.9 Hz, *J*=12.4 Hz), 146.4, 146.2, 144.8, 144.6, 126.7 (dd, *J*=9.6 Hz, *J*=2.9 Hz), 122.0 (dd, *J*=12.4 Hz, *J*=3.9 Hz), 111.5 (dd, *J*=21.9 Hz, *J*=3.8 Hz), 104.6 (dd, *J*=26.6 Hz, *J*=23.9 Hz).

3-{[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl}pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ8 Sumární vzorec: C₁₃H₈F₃N₃O₃ M.h.: 311,22 g/mol

log P: 1,49 Clog P: 1,6486 log k: -1,4586

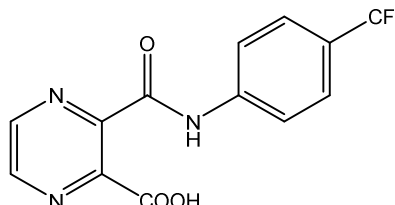
Teplota tání: 153,5-154,7 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

0,9320 g (89,8%)

(připraveno z 500 mg (3,35 mmol) výchozí látky)



Elementární analýza:

teoretická: C 50,17 %; H 2,59 %; F 18,31 %; N 13,50 %; O 15,42 %

zjištěná: C 50,42 %; H 2,21 %; N 13,84 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3306 (N-H, CONH), 1706 (C=O, COOH), 1669 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 11.13 (s, 1H, NH), 8.92-8.91 (m 1H, pyrazin), 8.91-8.89 (m, 1H, pyrazin), 8.08-7.96 (m, 2H, Ar), 7.77-7.70 (m, 2H, Ar); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 166.4, 163.3, 146.4, 146.1, 145.7, 144.8, 142.2, 126.3 (q, J=3.8 Hz), 124.5 (q, J=270.9 Hz), 124.4 (q, J=31.4 Hz), 120.2

3-[(2-hydroxy-5-nitrofenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ9 Sumární vzorec: C₁₂H₈N₄O₆ M.h.: 304,22 g/mol

log P: -0,26 Clog P: 0,6726 log k: -1,6214

Teplota tání: 290,0-291,3 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

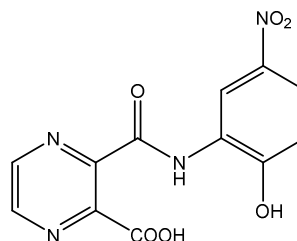
Výtěžnost reakce:

1,8227 g (89,9 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 47,38 %; H 2,65 %; N 18,42 %; O 31,55 %

zjištěná: C 44,19 %; H 3,13 %; N 17,15 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3271 (O-H, OH), 3116 (N-H, CONH), 3048 (O-H, COOH), 1709 (C=O, COOH), 1610 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.73 (bs, 1H, COOH), 12.08 (bs, 1H, OH), 10.25 (s, 1H, NH), 9.16 (d, J = 2.8 Hz, 1H, Ar), 8.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.00 – 7.96 (m, 1H, Ar), 7.11 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.66, 161.15, 153.61, 147.46, 147.04, 144.49, 141.76, 139.49, 126.02, 121.49, 115.12, 114.78.

3-[(5-chlor-2-hydroxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ10 **Sumární vzorec:** C₁₂H₈ClN₃O₄ **M.h.:** 293,66 g/mol

log P: 0,74 **Clog P:** 1,2926 **log k:** -1,5836

Teplota tání: 263,1-265,1 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

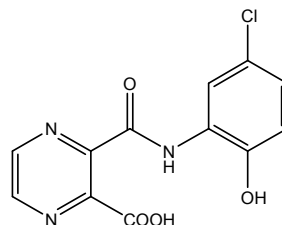
Výtěžnost reakce:

1,8875 g (96,5 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 49,08 %; H 2,75 %; Cl 12,07 %; N 14,31 %; O 21,79 %

zjištěná: C 49,69 %; H 2,69 %; N 14,17 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3341 (N-H, CONH), 3051 (O-H, COOH), 1732 (C=O, COOH), 1701 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.78 (bs, 1H, COOH), 10.68 (s, 1H, OH), 10.16 (s, 1H, NH), 8.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.29 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar), 7.07 – 7.03 (m, 1H, Ar), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.74, 160.59, 147.63, 146.97, 146.02, 144.37, 141.58, 126.94, 124.38, 122.70, 119.30, 116.21.

3-[(5-fluor-2-methylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ11 **Sumární vzorec:** C₁₃H₁₀FN₃O₃ **M.h.:** 275,24 g/mol

log P: 1,21 **Clog P:** 0,7339 **log k:** -1,5166

Teplota tání: 185,0-186,1 °C

Vzhled: béžová krystalická látka

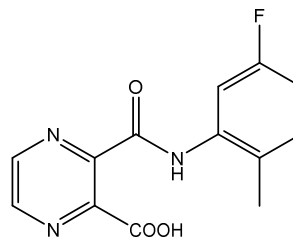
Výtěžnost reakce:

1,6860 g (91,9 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 56,73 %; H 3,66 %; F 6,90 %; N 15,27 %; O 17,44 %

zjištěná: C 56,84%; H 3,81%; N 14,93%



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3301 (N-H, CONH), 2983 (O-H, COOH), 1746 (C=O, COOH), 1670 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.83 (bs, 1H, COOH), 10.26 (s, 1H, NH), 8.92 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, pyrazin), 8.90 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, pyrazin), 7.51 (dd, 1H, *J*=9.1 Hz *J*=2.9 Hz, Ar), 7.01 (dd, 1H, *J*=9.1 Hz *J*=6.9 Hz, Ar), 7.00 (dt, 1H, *J*=9.1 Hz *J*=2.9 Hz, Ar), 2.25 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 166.4, 162.7, 160.4 (d, *J*=240.3 Hz), 146.3, 146.1, 145.2, 144.9, 136.9 (d, *J*=10.4 Hz), 131.8 (d, *J*=8.5 Hz), 127.5 (d, *J*=2.9 Hz), 112.3 (d, *J*=21.0 Hz), 111.0 (d, *J*=24.8 Hz), 17.1.

3-[(2-chlor-5-methylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová

kyselina

Označení: LSPJ12 Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClN₃O₃ M.h.: 291,69 g/mol

log P: 1,61 Clog P: 1,1039 log k: -1,4075

Teplota tání: 190,1-191,2 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

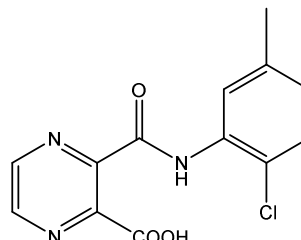
Výtěžnost reakce:

1,7538 g (90,2 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 53,53 %; H 3,46 %; Cl 12,15 %; N 14,41 %; O 16,45 %

zjištěná: C 53,88 %; H 3,37 %; N 14,32 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3342 (N-H, CONH), 2964 (O-H, COOH), 1701 (C=O, COOH), 1664 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 13.79 (bs, 1H, COOH), 10.34 (s, 1H, NH), 8.94 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.91 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 7.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.09 – 7.05 (m, 1H, Ar), 2.33 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 166.56, 161.54, 147.20, 146.73, 144.57, 142.86, 137.65, 133.83, 129.34, 127.35, 124.58, 122.67, 20.86.

3-[[3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová

kyselina

Označení: LSPJ13 Sumární vzorec: C₁₃H₈F₃N₃O₃ M.h.: 311,22 g/mol

log P: 1,49 Clog P: 1,6486 log k: -1,4867

Teplota tání: 176,3-177,1 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

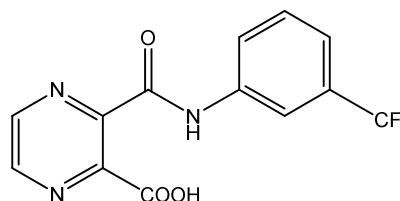
Výtěžnost reakce:

2,0124 g (97,1 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 50,17 %; H 2,59 %; F 18,31 %; N 13,50 %; O 15,42 %

zjištěná: C 49,86 %; H 2,75 %; N 13,42 %



IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3356 (N-H, CONH), 3064 (O-H, COOH), 1718 (C=O, COOH), 1694 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 11.14 (s, 1H, NH), 8.93 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, pyrazin), 8.91 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, pyrazin), 8.30-8.28 (m, 1H, Ar), 8.01 (d, 1H, *J*=7.9 Hz, Ar), 7.62 (t, 1H, *J*=7.9 Hz, Ar), 7.50 (d, 1H, *J*=7.9 Hz, Ar); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 166.4, 163.1, 146.5, 146.2, 145.2, 144.8, 139.4, 130.3, 129.7 (q, *J*=31.4 Hz), 124.3 (q, *J*=271.8 Hz), 123.9, 120.8 (q, *J*=3.8 Hz), 116.4 (q, *J*=3.8 Hz).

3-[(4-nitrofenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ14 Sumární vzorec: C₁₂H₈N₄O₅ M.h.: 288,22 g/mol

log P: 0,13 Clog P: 0,5210 log k: -1,5166

Teplota tání: 158,8-159,3 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

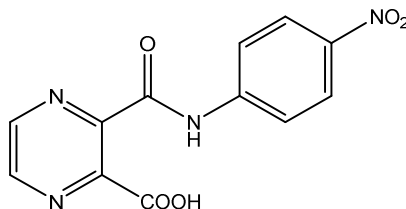
1,1105 g (57,8 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 50,01 %; H 2,80 %; N 19,44 %; O 27,75 %

zjištěná: C 34,79 %; H 2,91 %; N 12,93 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3129 (N-H, CONH), 1701 (C=O, COOH), 1598 (C=O, CONH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.27 (s, 1H, NH), 8.74 (d, J = 2.6 Hz, 1H, pyrazin), 8.66 (d, J = 2.6 Hz, 1H, pyrazin), 8.26 – 8.18 (m, 2H, Ar), 7.93 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 166.99, 166.35, 149.95, 149.10, 146.11, 144.57, 143.60, 142.63, 125.35, 119.55.



3-[[4-(dimethylamino)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Označení: LSPJ15 Sumární vzorec: C₁₄H₁₄N₄O₃ M.h.: 286,29 g/mol

log P: 0,85 Clog P: 0,8937 log k: -1,5166

Teplota tání: 184,2-184,8 °C

Vzhled: hnědá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

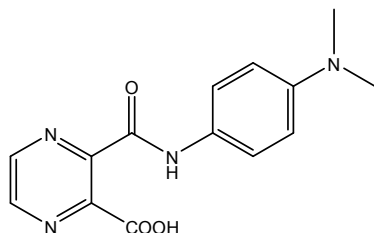
0,7218 g (37,8 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 58,74 %; H 4,93 %; N 19,57 %; O 16,77 %

zjištěná: C 55,03 %; H 5,09 %; N 18,22 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3493 (N-H, CONH), 1681 (C=O, CONH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.48 (s, 1H, NH), 8.86 – 8.84 (m, 2H, pyrazin), 7.63 – 7.57 (m, 2H, Ar), 6.75 – 6.70 (m, 2H, Ar), 2.87 (s, 6H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ 166.71, 161.46, 147.78, 146.87, 145.65, 145.37, 144.39, 128.22, 121.56, 112.64, 39.20.



Methylester kyseliny 3-(fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS95 **Sumární vzorec:** C₁₃H₁₁N₃O₃ **M.h.:** 257,25 g/mol

log P: 0,83 **Clog P:** 0,7710

Teplota tání: 81,8-82,7 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

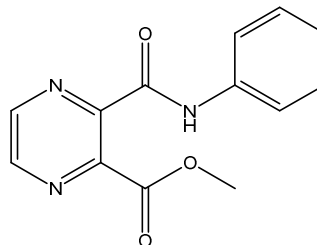
187,5 mg (71 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 60,70 %; H 4,31 %; N 16,33 %; O 18,66 %

zjištěná: C 60,35 %; H 4,55 %; N 16,79 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3349 (N-H, CONH), 1735 (C=O, COO), 1678 (C=O, CONH), 1142, 1087 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.83 (s, 1H, NH), 8.96 – 8.93 (m, 2H, pyrazin), 7.81 – 7.76 (m, 2H, Ar), 7.40 – 7.35 (m, 2H, Ar), 7.18 – 7.12 (m, 1H, Ar), 3.89 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.58, 161.96, 146.65, 146.24, 145.52, 145.15, 138.24, 128.95, 124.56, 120.52, 53.07.



Methylester kyseliny 3-[(2,5-dimethylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS96 **Sumární vzorec:** C₁₅H₁₅N₃O₃ **M.h.:** 285,30 g/mol

log P: 1,81 **Clog P:** 1,1190

Teplota tání: 132,1-134,6 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

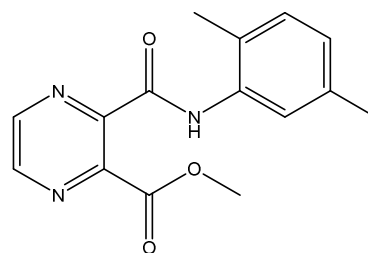
175,30 mg (67 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 63,15 %; H 5,30 %; N 14,73 %; O 16,82 %

zjištěná: C 62,71 %; H 5,49 %; B 14,92 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3379 (N-H, CONH), 1735 (C=O, COO), 1683 (C=O, CONH), 1121, 1082 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.26 (s, 1H, NH), 8.96 – 8.93 (m, 2H, pyrazin), 7.38 – 7.35 (m, 1H, Ar), 7.15 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.01 – 6.96 (m, 1H, Ar), 3.88 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 2.21 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.65, 161.75, 146.33, 145.63, 145.19, 144.69, 135.44, 135.29, 130.39, 129.19, 126.81, 125.52, 53.02, 20.77, 17.34.



Methylester kyseliny 3-[(4-ethylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2- karboxylové

Označení: LS97 **Sumární vzorec:** C₁₅H₁₅N₃O₃ **M.h.:** 285,30 g/mol

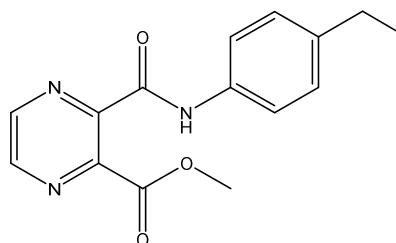
log P: 1,74 **Clog P:** 1,7990

Teplota tání: 89,1-90,7 °C

Vzhled: světle hnědá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

152,5 mg (58%)



Elementární analýza:

teoretická: C 63,15%; H 5,30 %; N 14,73 %; O 16,82 %

zjištěná: C 62,88 %; H 5,23 %; N 14,92 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3356 (N-H, CONH), 1737 (C=O, COO), 1686 (C=O, CONH), 1147, 1083 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.76 (s, 1H, NH), 8.95 – 8.92 (m, 2H, pyrazin), 7.72 – 7.67 (m, 2H, Ar), 7.23 – 7.18 (m, 2H, Ar), 3.88 (s, 3H, CH₃), 2.58 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.19 – 1.14 (m, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.63, 161.69, 146.19, 145.62, 145.12, 145.08, 140.07, 135.92, 128.14, 120.59, 53.04, 27.84, 15.84.

Methylester kyseliny 3-[(2,4-dimethoxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2- karboxylové

Označení: LS98 **Sumární vzorec:** C₁₅H₁₅N₃O₅ **M.h.:** 317,30 g/mol

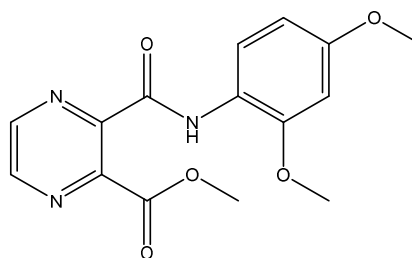
log P: 0,58 **Clog P:** 0,0790

Teplota tání: 192,5-194,2 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

155,30 mg (59 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 56,78 %; H 4,77 %; N 13,24 %; O 25,21 %

zjištěná: C 56,83 %; H 4,56 %; N 13,44 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3367 (N-H, CONH), 1740 (C=O, COO), 1676 (C=O, CONH), 1124, 1084 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 9.99 (s, 1H, NH), 8.95 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.94 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 6.71 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar), 6.59 – 6.55 (m, 1H, Ar), 3.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.88, 159.72, 157.33, 150.75, 146.81, 146.26, 144.91, 142.39, 121.52, 119.60, 104.56, 99.12, 56.27, 55.56, 53.00.

Methylester kyseliny 3-[(4-bromfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS100 Sumární vzorec: C₁₃H₁₀BrN₃O₃ M.h.: 336,15 g/mol

log P: 1,66 Clog P: 1,6450

Teplota tání: 128,5-130,4 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

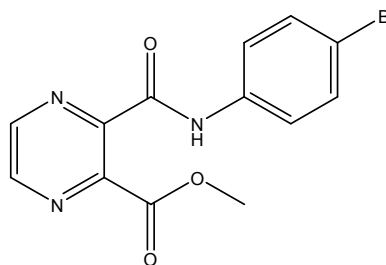
172,40 mg (66 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 46,45 %; H 3,00 %; Br 23,77 %; N 12,50 %; O 14,28 %

zjištěná: C 46,11 %; H 2,76 %; N 12,19 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3326 (N-H, CONH), 1742 (C=O, COO), 1686 (C=O, CONH), 1174, 1071 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.99 (s, 1H, NH), 8.96 – 8.94 (m, 2H, pyrazin), 7.80 – 7.76 (m, 2H, Ar), 7.58 – 7.55 (m, 2H, Ar), 3.88 (s, 3H, CH 3); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.51, 162.07, 146.64, 146.39, 145.18, 144.87, 137.64, 131.79, 122.45, 116.39, 53.10.



Methylester kyseliny 3-[(2,4-difluorfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS102 Sumární vzorec: C₁₃H₉F₂N₃O₃ M.h.: 293,23 g/mol

log P: 1,15 Clog P: 0,4719

Teplota tání: 165,9-167,4 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

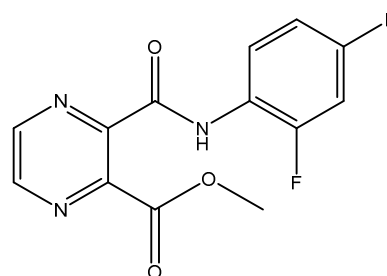
190,00 mg (72 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 53,25 %; H 3,09 %; F 12,96 %; N 14,33 %; O 16,37 %

zjištěná: C 53,36 %; H 2,76 %; N 14,53 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3348 (N-H, CONH), 1739 (C=O, COO), 1693 (C=O, CONH), 1143, 1103, 1082 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.63 (bs, 1H, NH), 8.96 (s, 2H, pyrazin), 7.82-7.74 (m, 1H, Ar), 7.43-7.36 (m, 1H, Ar), 7.18-7.11 (m, 1H, Ar), 3.87 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 165.5, 162.2, 159.7 (dd, J=245.1 Hz, J=13.7 Hz), 155.4 (dd, J=249.9 Hz, J=13.5 Hz), 146.7, 145.5, 143.4, 144.1, 127.2 (dd, J=9.6 Hz, J=1.9 Hz), 121.7 (dd, J=12.4 Hz, J=3.9 Hz), 111.6 (dd, J=22.0 Hz, J=3.9 Hz), 104.7 (dd, J=26.6 Hz, J=23.8 Hz), 53.1.



Methylester kyseliny 3-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS103 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₀F₃N₃O₃ **M.h.:** 325,25 g/mol

log P: 1,75 **Clog P:** 1,6799

Teplota tání: 146,8-148,2 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

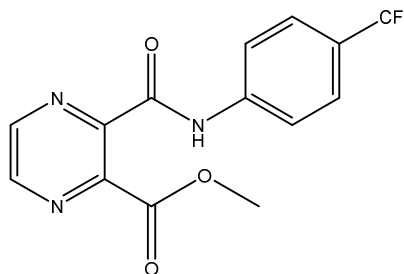
131,60 mg (50 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 51,70 %; H 3,10 %; F 17,52 %; N 12,92 %; O 14,76 %

zjištěná: C 51,92 %; H 3,57 %; N 13,01 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3297 (N-H, CONH), 1746 (C=O, COO), 1691 (C=O, CONH), 1112, 1063 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)** δ 9.73 (bs, 1H, NH), 8.82 (d, 1H, *J*=2.2 Hz, pyrazin), 8.69 (d, 1H, *J*=2.2 Hz, pyrazin), 7.87-7.84 (m, 2H, Ar), 7.65-7.62 (m, 2H, Ar), 4.09 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)** δ 166.0, 159.8, 148.0, 146.5, 145.5, 143.1, 141.2, 126.8 (q, *J*=33.8 Hz), 126.4 (q, *J*=3.8 Hz), 123.9 (q, *J*=270.9 Hz), 119.7, 53.4.



Methylester kyseliny 3-[[2-hydroxy-5-nitrofenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS104 **Sumární vzorec:** C₁₃H₁₀N₄O₆ **M.h.:** 318,25 g/mol

log P: 0,21 **Clog P:** 0,7040

Teplota tání: 226,4-228,6 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

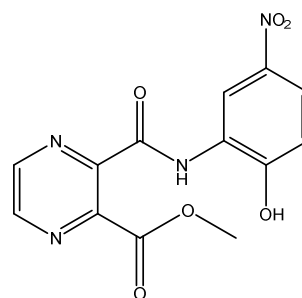
157,50 mg (60 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 49,06 %; H 3,17 %; N 17,61 %; O 30,16 %

zjištěná: C 48,76 %; H 3,05 %; N 17,52 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3317 (N-H, CONH), 1732 (C=O, COO), 1683 (C=O, CONH), 1267, 1095 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 12.10 (bs, 1H, OH), 10.29 (s, 1H, NH), 9.10 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, Ar), 8.99 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.97 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.01 – 7.94 (m, 1H, Ar), 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, Ar), 3.95 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.71, 160.66, 153.69, 147.28, 146.16, 145.12, 141.83, 139.46, 125.81, 121.65, 115.15, 114.79, 53.19.



Methylester kyseliny 3-[(5-chlor-2-hydroxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS105 Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClN₃O₄ M.h.: 307,69 g/mol

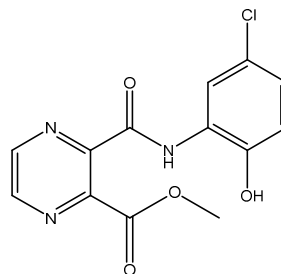
log P: 1,0 Clog P: 1,3470

Teplota tání: 174,2–176,9 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

189,80 mg (72 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 50,75 %; H 3,28 %; Cl 11,52 %; N 13,66 %; O 20,80 %

zjištěná: C 50,39%; H 3,19%; N 13,72%

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3316 (N-H, CONH), 1735 (C=O, COO), 1681 (C=O, CONH), 1148, 1091 (C–O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.71 (s, 1H, OH), 10.19 (s, 1H, NH), 8.98 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.25 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, Ar), 7.09 – 7.03 (m, 1H, Ar), 6.95 (d, 1H, Ar), 3.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.80, 160.17, 147.20, 146.66, 146.10, 145.02, 141.77, 126.72, 124.55, 122.69, 119.34, 116.23, 53.13.

Methylester kyseliny 3-[(5-fluor-2-methylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS106 Sumární vzorec: C₁₄H₁₂FN₃O₃ M.h.: 289,27 g/mol

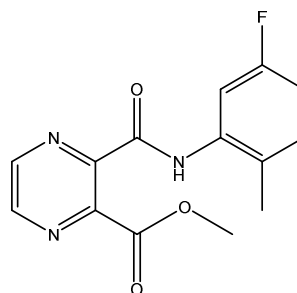
log P: 1,48 Clog P: 0,7740

Teplota tání: 174,2–176,9 °C

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

199,70 mg (76 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 58,13 %; H 4,18 %; F 6,57 %; N 14,53 %; O 16,59 %

zjištěná: C 57,74 %; H 3,97 %; N 14,26 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3375 (N-H, CONH), 1741 (C=O, COO), 1692 (C=O, CONH), 1142, 1112 (C–O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.36 (bs, 1H, NH), 8.97–8.95 (m, 2H, pyrazin), 7.49 (dd, 1H, *J*=9.7 Hz *J*=2.9 Hz, Ar), 7.33–7.28 (1H, m, Ar), 7.01 (dt, 1H, *J*=9.7 Hz *J*=2.9 Hz, Ar), 3.89 (s, 3H, CH₃), 2.24 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (125 MHz, DMSO)** δ 165.5, 162.0, 160.3 (d, *J*=240.3 Hz), 146.5, 145.3, 144.5, 144.1, 136.7 (d, *J*=10.4 Hz), 131.8 (d, *J*=9.4 Hz), 127.7 (d, *J*=2.9 Hz), 112.5 (d, *J*=21.0 Hz), 111.2 (d, *J*=24.8 Hz), 53.1, 17.0.

Methylester kyseliny 3-[(2-chlor-5-methylfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS107 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₂ClN₃O₃ **M.h.:** 305,72 g/mol

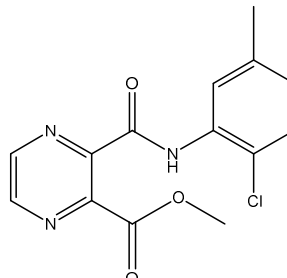
log P: 1,88 **Clog P:** 1,1440

Teplota tání: 166,7-168,8 °C

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

194,00 mg (74 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 55,00 %; H 3,96 %; Cl 11,60 %; N 13,75 %; O 15,70 %

zjištěná: C 55,43 %; H 3,85 %; N 13,88 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3349 (N-H, CONH), 1737 (C=O, COO), 1689 (C=O, CONH), 1144, 1088 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.43 (s, 1H, NH), 8.99 – 8.97 (m, 2H, pyrazin), 7.86 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.44 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.12 – 7.05 (m, 1H, Ar), 3.91 (s, 3H, CH₃), 2.33 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 165.63, 161.15, 147.02, 146.00, 145.19, 142.85, 137.73, 133.66, 129.36, 127.60, 124.87, 123.02, 53.13, 20.83.

Methylester kyseliny 3-[[3-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS108 **Sumární vzorec:** C₁₄H₁₀F₃N₃O₃ **M.h.:** 325,25 g/mol

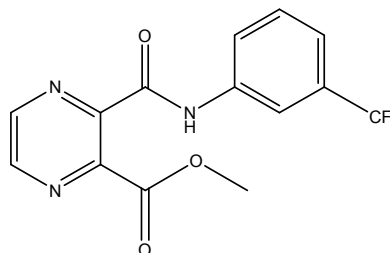
log P: 1,75 **Clog P:** 1,6799

Teplota tání: 106,3-108,5 °C

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

136,20 mg (52 %)



Elementární analýza:

teoretická: C 51,70 %; H 3,10 %; F 17,52 %; N 12,92 %; O 14,76 %

zjištěná: C 51,95 %; H 3,41 %; N 12,83 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3357 (N-H, CONH), 1748 (C=O, COO), 1693 (C=O, CONH), 1110, 1081 (C-O, COO); **¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)** δ 9.71 (bs, 1H, NH), 8.82 (d, 1H, *J*=2.2 Hz, pyrazin), 8.69 (d, 1H, *J*=2.2 Hz, pyrazin), 8.08 (s, 1H, Ar), 7.93 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, Ar), 7.51 (t, 1H, *J*=8.0 Hz, Ar), 7.43 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, Ar), 4.10 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)** δ 166.0, 159.8, 148.0, 146.5, 145.5, 143.1, 137.4, 131.6 (q, *J*=33.3 Hz), 129.7, 123.0, 123.7 (q, *J*=271.9 Hz), 121.6 (q, *J*=3.8 Hz), 116.7 (q, *J*=3.9 Hz), 53.4.

***N*-[4-(nitrofenyl)pyrazin-2-karboxamid]⁵⁸**

produkt vzniklý neplánovanou dekarboxylací při esterifikaci kyseliny 3-[(4-nitrofenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS109 **Sumární vzorec:** C₁₁H₈N₄O₃ **M.h.:** 244,21 g/mol

log *P*: 0,54 **Clog *P*:** 1,2751

Teplota tání: 241,1-242,2 °C (222 °C⁵⁸ v literatuře)

Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Výtěžnost reakce:

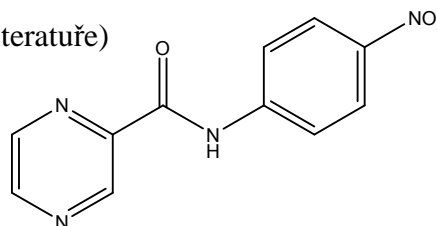
67,70 mg (32 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 54,10 %; H 3,30 %; N 22,94 %; O 19,65 %

zjištěná: C 54,03 %; H 2,97 %; N 23,16 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3350 (N-H, CONH), 1696 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 11.30 (s, 1H, NH), 9.31 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.96 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5), 8.83 (dd, *J* = 2.4, 1.5 Hz, 1H, H6), 8.31 – 8.15 (m, 4H, Ar); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 162.72, 148.24, 144.68, 144.56, 144.51, 143.44, 143.09, 124.84, 120.53.



***N*-[4-(dimethylamino)fenyl]pyrazin-2-karboxamid**

produkt vzniklý neplánovanou dekarboxylací při esterifikaci kyseliny 3-[[4-(dimethylamino)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové

Označení: LS110 **Sumární vzorec:** C₁₃H₁₄N₄O **M.h.:** 242,28 g/mol

log *P*: 0,87 **Clog *P*:** 1,6295

Teplota tání: 189,1-190,7 °C

Vzhled: oranžová krystalická látka

Výtěžnost reakce:

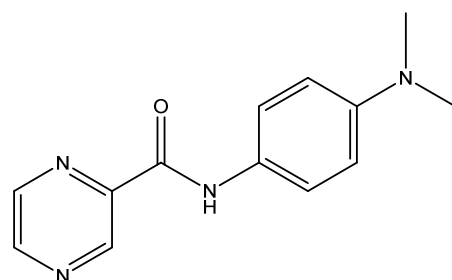
135,10 mg (64 %)

Elementární analýza:

teoretická: C 64,45 %; H 5,82 %; N 23,13 %; O 6,60 %

zjištěná: C 64,75 %; H 5,44 %; N 22,99 %

IR (ATR-Ge, cm⁻¹): 3351 (N-H, CONH), 1668 (C=O, CONH); **¹H NMR (500 MHz, DMSO)** δ 10.44 (s, 1H, NH), 9.26 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.89 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5), 8.78 – 8.75 (m, 1H, H6), 7.72 – 7.66 (m, 2H, Ar), 6.76 – 6.69 (m, 2H, Ar), 2.87 (s, 6H, CH₃); **¹³C NMR (126 MHz, DMSO)** δ 160.88, 147.76, 147.50, 145.51, 143.95, 143.28, 127.94, 121.87, 112.53, 40.52.



3.6 Metodika testování

3.6.1 Experimentální měření lipofility

Mobilní fáze se skládala z methanolu (HPLC grade, 70 %) a H₂O (HPLC-Milli-Q grade, 30 %). Měření probíhalo při podmínkách: průtok 1,0 ml/min, vstřikovaný objem vzorku 20 µl, teplota kolony 30 °C, detekční vlnová délka 210 nm, monitorovací vlnová délka 270 nm. Retenční časy (t_R) byly měřeny v minutách. Čas odpovídající mrtvému objemu systému (t_D) byl určen jako retenční čas KI v methanolu. Kapacitní faktor k pro jednotlivé sloučeniny byl vypočten podle vzorce $k = (t_R - t_D)/t_D$. Log k , vypočtený z kapacitního faktoru k , se používá jako index lipofility.

3.6.2 Antimykobakteriální testování

Antimykobakteriální aktivita nově připravených látek byla testována MUDr. Pavlou Paterovou z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Testování probíhalo *in vitro* na kmenech *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 a *M. avium subsp. avium* Chester CNCTC My 80/72, získaných od České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Národního institutu veřejného zdraví, Praha, Česká republika. Jako kultivační médium byl použit bujón Middlebrook 7H9 s přídavkem glycerolu a růstového doplňku OADC (kyselina olejová, albumin, dextrosa, katalasa: Himedia, Bombaj, Indie) s konečným pH 6,6. Použita byla mikrodiluční metoda ve srovnání s isoniazidem jako standardem. Testované sloučeniny byly rozpuštěny a zředěny v DMSO a smíchány s růstovým médiem do konečné koncentrace 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 a 1,56 µg.ml⁻¹. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 1 % (v/v) a neměla vliv na růst mykobakterií. Kultury byly pěstovány v médiu Middlebrook 7H9 při teplotě 37 °C ve vlhkém a temném prostředí. Antimykobakteriální aktivita byla stanovena pomocí Alamar blue zbarvení (hodnotí se oxidačně-redukční změna zbarvení z modrého na růžové za přítomnosti živých mykobakterií)⁵⁹ po 14 dnech

inkubace jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tj. minimální koncentrace testované látky inhibující růst.

3.6.3 Anifungální testování

Připravené látky byly testovány vůči osmi kmenům hub (Tabulka 7) *in vitro* za použití mikrodilučního bujónového testu. Jako kultivační médium byl použit bujón RPMI 1640 s glutaminem, pufovaný na pH 7 3-morfolinopropyl-1-sulfonovou kyselinou (0,65M). Doba inkubace byla 24-48 h (u TM 48-72 h) při teplotě 35 °C. Způsob inkubace byl statický, ve tmě, v humidní atmosféře. Odečítání bylo vizuální, a aktivita byla vyjádřena jako MIC, tj. minimální koncentrace testované látky inhibující růst. Jako standard byl použit flukonazol a amfotericin B (hodnoty MIC lze nalézt v Tabulce 8).

3.6.4 Antibakteriální testování

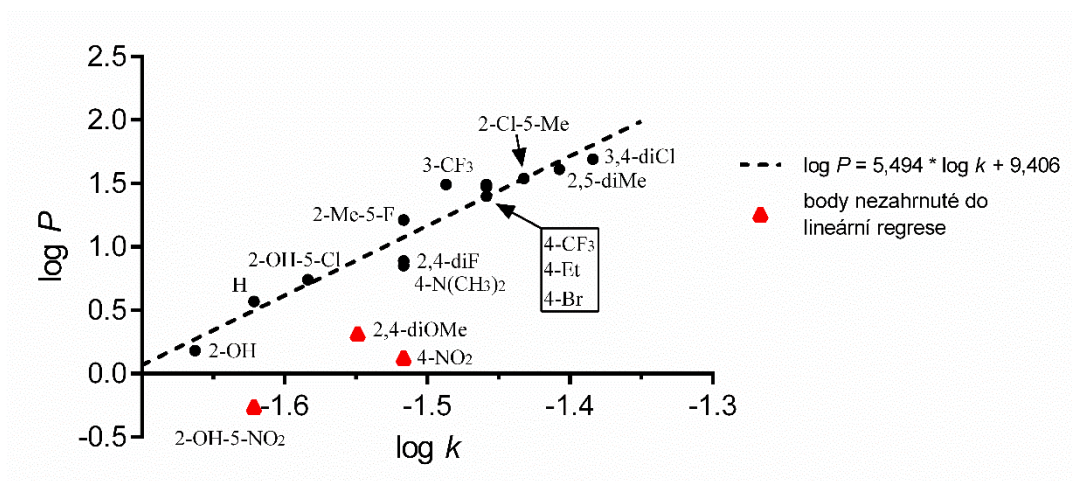
Připravené látky byly testovány vůči osmi bakteriálním kmenům (Tabulka 13) *in vitro* za použití mikrodiluční bujónové metody. Za použití Mueller Hintonova bujónu. Koncentrace inokulační suspenze byla upravena na 0.5 dle McFarlandovy stupnice. Způsob inkubace byl statický, ve tmě, v humidní atmosféře při teplotě 35 °C. Délka inkubace byla 24-48 h (u *Pseudomonas aeruginosa* 72-120 h). Odečítání bylo vizuální, vyjádřeno jako MIC, tj. minimální koncentrace testované látky inhibující viditelný růst. Jako standardy byly použity vankomycin MIC = 0,34-0,69 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a gentamicin MIC \leq 0,26-1,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.7 Výsledky

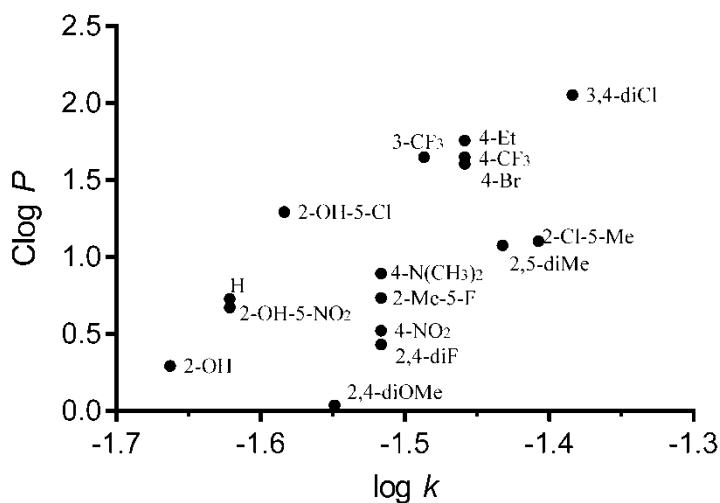
3.7.1 Experimentální měření lipofility

Pro substituované 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly experimentálně změřeny hodnoty kapacitního faktoru k (vyjádřeno jako $\log k$), které jsou uvedeny u jednotlivých látek. Pro porovnání vypočítaných lipofilních parametrů $\log P$ a $\text{Clog } P$ s experimentálně změřeným $\log k$ byly vytvořeny grafy závislosti $\log P$ na $\log k$ (Graf 1) a $\text{Clog } P$ na $\log k$ (Graf 2).

Graf 1 Závislost počítaného $\log P$ na experimentálně určeném $\log k$ v sérii 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin (LSVL2 a LSPJ1 – LSPJ15)



Graf 2 Závislost počítaného $\text{Clog } P$ na experimentálně určeném $\log k$ v sérii 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylových kyselin (LSVL2 a LSPJ1 – LSPJ15)



3.7.2 Antimykobakteriální aktivita

Výsledky testování látek pro jejich antimykobakteriální aktivitu jsou uvedeny v Tabulce 4 a 5. Látky jsou pro přehlednost uspořádány tak, aby pod příslušnou kyselinou byl uveden její methylester.

Tabulka 4 Výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity, n.t. = netestováno, zvýrazněné řádky odpovídají methylesterům příslušné kyseliny

Testovaná látka	R	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]		
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
LS95	H	>100	>100	>100
LSPJ1	2,5-diCH ₃	>100	>100	>100
LS96	2,5-diCH ₃	>100	>100	>100
LSPJ2	4-CH ₂ CH ₃	>100	n.t.	n.t.
LS97	4-CH ₂ CH ₃	>100	>100	100
LSPJ3	2,4-diOCH ₃	>100	n.t.	n.t.
LSPJ4	3,4-diCl	100	n.t.	n.t.
LSPJ5	4-Br	50	n.t.	n.t.
LS100	4-Br	>100	>100	>100
LSPJ6	2-OH	50	n.t.	n.t.
LSPJ7	2,4-diF	>100	n.t.	n.t.
LS102	2,4-diF	>100	>100	>100
LSPJ8	4-CF ₃	>100	n.t.	n.t.
LS103	4-CF ₃	>100	>100	>100
LSPJ9	2-OH-5-NO ₂	>100	n.t.	n.t.
LS104	2-OH-5-NO ₂	100	>100	>100
LSPJ10	2-OH-5-Cl	100	n.t.	n.t.
LS105	2-OH-5-Cl	>100	>100	>100
LSPJ11	2-CH ₃ -5-F	>100	n.t.	n.t.
LS106	2-CH ₃ -5-F	>100	>100	>100
LSPJ12	2-Cl-5-CH ₃	>100	>100	>100
LS107	2-Cl-5-CH ₃	> 50	> 50	> 50

Tabulka 5 Výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity, n.t. = netestováno, zvýrazněné řádky odpovídají methylesterům příslušné kyseliny - pokračování

Testovaná látka	R	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]		
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kansasii</i>
LSPJ13	3-CF ₃	100	>100	>100
LS108	3-CF ₃	>100	>100	>100
LSPJ14	4-NO ₂	>100	>100	>100
LS109	4-NO ₂	> 50	> 50	> 50
LSPJ15	4-N(CH ₃) ₂	50	>100	>100
LS 110	4-N(CH ₃) ₂	>100	>100	>100
INH	-	0,2	6,25	3,13

Tabulka 6 Hodnoty MIC pyrazinamidu v závislosti na pH

Testovaná látka	pH	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	ref.
		<i>M. tuberculosis</i>	
PZA	5,6	6,25-25	60,61
	6	125	62
	7	>250	47

3.7.3 Antifungální aktivita

Tabulka 7 Testované kmeny

Testované kmeny (kód, číslo)	
1. CA1 <i>Candida albicans</i> ATCC 44859	5. TA <i>Trichosporon asahii</i> 1188
2. CT <i>Candida tropicalis</i> 156	6. AF <i>Aspergillus fumigatus</i> 231
3. CK2 <i>Candida krusei</i> E28	7. LC <i>Lichtheimia corymbifera</i>
4. CG <i>Candida glabrata</i> 20/I	8. TM <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445

Tabulka 8 Antifungální aktivita flukonazolu a amfotericinu B

standard MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Kmen (kód)							
	CA	CT	CK	CG	TA	AF	LC	TM
flukonazol	1	2	104	26	209	> 836	> 836	104
amfotericin B	0,016	0,063	0,125	0,031	1	0,25	1	1

Tabulka 9 Výsledky hodnocení antifungální aktivity

Kmen (kód)		Testovaná látka (kód) MIC($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
		LSVL2	LSPJ1	LSPJ2	LSPJ3	LSPJ4	LSPJ5	LSPJ6	LSPJ7
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
LC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 10 Výsledky hodnocení antifungální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
	LSPJ8	LSPJ9	LSPJ10	LSPJ11	LSPJ12	LSPJ13	LSPJ14	LSPJ15
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
LC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 11 Výsledky hodnocení antifungální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)						
	LS95	LS96	LS97	LS98	LS100	LS102	LS103
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
LC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 12 Výsledky hodnocení antifungální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
	LS104	LS105	LS106	LS107	LS108	LS109	LS110	
CA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CT	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CK	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
CG	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
LC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
TM	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

3.7.4 Antibakteriální aktivita

Tabulka 13 Testované kmeny

Testované kmeny (kód, číslo)	
1. SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08	5. EC <i>Escherichia coli</i> CCM4517
2. MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 methicilin rezistentní	6. KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D11750/08
3. SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08	7. KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL pozitivní
4. EF <i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08	8. PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961

Tabulka 14 Antibakteriální aktivita gentamicinu a vankomycinu

	Kmen (kód)							
	SA	MRSA	SE	EF	EC	KP	KP-E	PA
gentamicin MIC($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,34	0,34	0,34	0,69	-	-	-	-
vankomycin MIC($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	-	-	-	-	$\leq 0,26$	$\leq 0,26$	$\leq 0,26$	$\leq 1,05$

Tabulka 15 Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
	LSSL2	LSPJ1	LSPJ2	LSPJ3	LSPJ4	LSPJ5	LSPJ6	LSPJ7
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24h	500	>500	>500	>500	>500	500	>500
	48h	500	>500	>500	>500	>500	500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 16 Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)							
	LSPJ8	LSPJ9	LSPJ10	LSPJ11	LSPJ12	LSPJ13	LSPJ14	LSPJ15
SA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA	72h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 17 Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)						
	LS95	LS96	LS97	LS99	LS100	LS102	LS103
SA 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	500	>500
MRSA 24h 48h	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF 24h 48h	500	>500	>500	500	>500	>500	500
	>500	>500	>500	500	>500	>500	>500
EC 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA 72h 120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Tabulka 18 Výsledky hodnocení antibakteriální aktivity - pokračování

Kmen (kód)	Testovaná látka (kód) MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)						
	LS104	LS105	LS106	LS107	LS108	LS109	LS110
SA 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
MRSA 24h 48h	500	>500	>500	>500	>500	>500	500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
SE 24h 48h	>500	500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EF 24h 48h	500	>500	>500	>500	500	>500	500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
EC 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
KP-E 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
PA 72h 120h	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

4 Diskuze

Tato rigorózní práce se zaměřovala na přípravu derivátů kyseliny 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové a methylesterů této kyseliny. Celkem bylo připraveno 30 látek, 16 derivátů kyseliny 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové (lišících se substitucí na fenylovém jádře) a 12 methylesterů těchto kyselin a 2 deriváty *N*-fenyلكarboxamidu (vzniklé jako nečekaný produkt spontánní dekarboxylací při esterifikačním kroku). Tři připravené látky byly publikovány dříve – 3-(fenyلكarbamoyl)pyrazin-2-karboxylová kyselina⁵⁷ (LSVL2), 3-[(4-bromfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina⁶³ (LSPJ5) a poslední *N*-(4-nitrofenyl)pyrazin-2-karboxamid (LS109) byl testován vůči *M. tuberculosis* H37Rv (za použití alamar blue testu), kde se ukázal jako neaktivní (MIC > 100 µg.ml⁻¹).⁵⁸

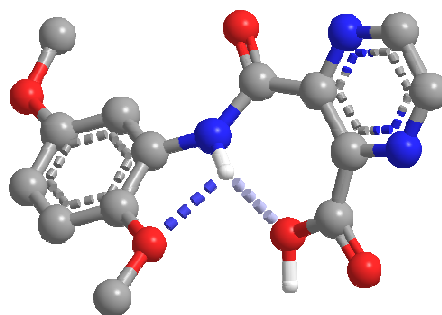
Syntéza probíhala ve dvou stupních. Nejprve jsme anhydrid kyseliny reakcí s příslušně substituovaným anilinem převedli na fenyلكarbamoyl karboxylovou kyselinu. Ve druhém stupni jsme tuto kyselinu esterifikovali za vzniku methylesterů této kyseliny. Výjimku tvořily látky *N*-(4-nitrofenyl)pyrazin-2-karboxamid (LS109) a *N*-[4-(dimethylamino)fenyl]pyrazin-2-karboxamid (LS110), kde došlo při esterifikaci ke spontánní dekarboxylaci. Původně cílený methylester při esterifikaci za daných podmínek nevznikal. Výťažky jednotlivých reakcí se pohybovaly mezi 37,8-98,8 % při syntéze karbamoyl karboxylových kyselin a 32-77 % při syntéze methylesterů. Hodnoty výtěžků byly závislé na reaktivitě sloučenin a na ztrátách, které vznikly v průběhu čištění látek.

U připravených sloučenin bylo změřeno NMR a IČ spektrum. Signál pro vodík karboxylové skupiny v ¹H NMR spektru se pohybuje v rozmezí 13,83-13,73 ppm v DMSO a není vždy viditelný. Amidický vodík -CONH- vykazuje signál v rozmezí 11,3-9,73 ppm v DMSO a 9,73-9,71 ppm v CDCl₃. Signál vodíků pyrazinového jádra se pohybuje v rozmezí 9,31-8,66 ppm v DMSO a 8,82-8,69 ppm v CDCl₃, v některých případech se vyskytovaly jako jeden signál, obvykle jde o signály dva.

Látky byly charakterizovány parametry lipofility, vypočítanými $\log P$ v rozmezí $-0,26 - 1,69$ a $\text{Clog}P$ v rozmezí $0,0367 - 2,0525$ a u karbamoyl karboxylových kyselin byly experimentálně změřeny hodnoty $\log k$ v rozmezí $-1,6628$ až $-1,3840$. Pro porovnání jednotlivých parametrů lipofility karbamoyl karboxylových kyselin byly vytvořeny grafy závislostí $\log P$ na $\log k$ (Graf 1) a $\text{Clog} P$ na $\log k$ (Graf 2). Závislost $\log P$ na $\log k$ byla lineární ($\log P = 5,494 * \log k + 9,406$, $R^2 = 0,92$, $n = 13$, $P < 0,0001$). Z lineární závislosti vybočují látky LSPJ3 ($R = 2,4\text{-diOCH}_3$), LSPJ9 ($R = 2\text{-OH-5-NO}_2$) a LSPJ14 ($R = 4\text{-NO}_2$).

U sloučenin s aromatickou nitroskupinou bývá dle našich zkušeností výpočet $\log P$ pomocí algoritmu ChemBioDraw nespolehlivý. Starší verze tohoto software dokonce nebyly schopny $\log P$ u těchto látek počítat vůbec. U sloučeniny LSPJ9 ($R = 2\text{-OH, 5-NO}_2$) navíc může hrát roli zvýšení acidity fenolického hydroxyly díky přítomnosti nitroskupiny. Z dalších strukturních charakteristik, které mohou být příčinou výraznějších rozdílů mezi počítanými a experimentálně měřenými parametry lipofility, lze uvažovat především konformační změny vyvolané objemnější *ortho* substitucí fenylového jádra, zvláště jsou-li tyto *ortho* substituenty schopny tvořit intramolekulární vodíkové můstky. To je případ sloučeniny LSPJ3 ($R = 2,4\text{-diOCH}_3$). Takovéto sloučeniny pak mohou tvořit síť intramolekulárních vodíkových můstků, viz Obr. 8. Trojrozměrná struktura na tomto obrázku byla získána nakreslením 2D molekuly v programu ChemBioDraw a vytvořením 3D struktury pomocí energetické minimalizace (silové pole MM2) v programu Chem3D Pro (v14.0, ChambridgeSoft, MA, USA). Z výše zmíněných důvodů bylo pro nás překvapující, že předpověď lipofility pro látky LSPJ6 ($R = 2\text{-OH}$) a LSPJ10 ($R = 2\text{-OH-5-Cl}$) odpovídala experimentálně určenému $\log k$. Z porovnání Grafu 1 a Grafu 2 vyplývá, že vypočítané hodnoty $\log P$ více korelují s experimentálně změřenými hodnotami $\log k$ než vypočítané hodnoty $\text{Clog} P$.

Obrázek 8 Intramolekulární můstky ve sloučenině LSPJ3



Byla testována antifungální (Tabulka 9-12) a antibakteriální (Tabulka 15-18) aktivita připravených sloučenin. Žádná látka nevykazuje významnou aktivitu. Nejúčinnější látkou byl methylester kyseliny 3-[(2,4-difluorfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylové (LS102), který vykazoval účinnost na *Staphylococcus aureus*, MIC byla $250 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Tabulka 17).

Při testování antimykobakteriální aktivity (Tabulka 4 a 5) se projeví jako nejúčinnější látky 3-[(4-bromfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ5), 3-[(2-hydroxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ6) a 3-[[4-(dimethylamino)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ15) s hodnotou MIC = $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pro *M. tuberculosis* H37Rv pro všechny tři látky. Látky LSPJ2 – LSPJ11 nebyly testovány na *M. avium* a *M. kansasii* (Tabulka 4). Pro látky LSVL2 a LS98 nebyly výsledky v době sepisování práce k dispozici.

Srovnání série derivátů kyseliny 3- (fenylkarbamoyl)pyrazin-2-karboxylové a otestovaných methylesterů této kyseliny naznačuje, že esterifikace kyseliny methanolem nevedla ke zvýšení aktivity. Důvodem neaktivity methylesterů může být také esterifikace právě methanolem, kdy došlo jen k nízkému zvýšení lipofility. Nebo vzniklé methylestery nebyly dostatečně stabilní. To vede k tomu, zda neuvažovat o esterifikaci delšími alkoholy s vyšší lipofilitou, např. dodecylalkoholem, tetradecylalkoholem či hexadecylalkoholem, které se ukázaly jako výhodné ve studii při esterifikaci POA⁶⁴ nebo esterifikaci stéricky chráněnými alkoholy, např. *terc*-butanolem, které by mohly vykazovat větší stabilitu v plasmě.⁶⁵

5 Závěr

Bylo připraveno 30 látek, z toho 27 zcela nových, v literatuře nepopsaných (dle rešerše v Chemical Abstracts dne 13.4.2016). Tyto látky vykazují vyšší hodnoty lipofility než POA ($\log P = -0,66$, $\text{Clog } P = 0,0999$), v rozmezí $\log P -0,26-1,69$, $\text{Clog } P 0,0367-2,0525$.

Látky byly charakterizovány NMR, IČ, teplotou tání a elementární analýzou. Byly vypočteny hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$ a u fenyلكarbamoyl karboxylových kyselin byly experimentálně změřeny hodnoty kapacitního faktoru k (vyjádřeny jako $\log k$), vyjadřující lipofilitu sloučenin.

Byla testována antimykobakteriální účinnost na *M. tbc*, *M. avium* a *M. kansasii*. Jako antimykobakteriálně nejúčinnější se jevily 3-[(4-bromfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ5), 3-[(2-hydroxyfenyl)karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ6) a 3-[[4-(dimethylamino)fenyl]karbamoyl]pyrazin-2-karboxylová kyselina (LSPJ15) s hodnotou MIC = 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro *M. tuberculosis* H37Rv pro všechny tři látky, ostatní látky nevykazovaly významnou aktivitu.

Neaktivita látek mohla být způsobena vlivem pH prostředí, molekuly mohly být ionizovány a neprocházet tak bariérami. Protože sám PZA, resp. POA, je aktivní pouze v kyselém prostředí a neutrálním je neaktivní (Tabulka 6).^{45,47,50} Změny struktury, které by mohly vést k aktivnějším sloučeninám, by mohly spočívat v přesunutí objemného fenyلكarbamoylového substituentu do polohy 5 nebo 6. Vycházíme z popsanych interakcí POA-RpsA¹, které ukazují, že pyrazinový uhlík C-3 v sousedství karboxylové skupiny je velmi blízko proteinu a nemůže tak být (na rozdíl od atomů C-5 a C-6) substituován objemnými substituenty. Tyto úvahy však platí pro předpokládaný mechanismus účinku inhibice trans-translace interakcí s RpsA. Vzhledem k tomu, že i u samotného PZA jsou uplatňovány i další mechanismy účinku (viz teoretická část práce), nebyla příprava 2,3-substituovaných derivátů popisovaných v této práci zbytečná. Další obměnou vedoucí k syntéze

aktivnějších látek by mohlo být prodloužení či rozvětvení esterového řetězce, což by přispělo k lipofilitě (lepšímu průniku) a stabilitě sloučenin.^{64,65}

6 Použitá literatura

1. YANG, J.; LIU, Y.; BI, J. et al.: Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Molecular Microbiology*. 2015, vol. 95, no. 5, p. 791-803. ISSN 0950382X.
2. RAJECOVÁ, E.; SOLOVIČ, I.: Súčasný pohľad na otázky v liečbe tuberkulózy. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2003, vol. 17, no. 1, p. 25-28. ISSN 1803-5353.
3. SOLOVIČ, I.: Tuberkulóza na začiatku 21. storočia – praktický pohľad. *Via practica*. 2004, vol. 1, no. 4, p. 215-219. ISSN 1339-424X.
4. BÁRTŮ, V.: Tuberkulóza – Infekční choroba v 21. století. *Med. pro Praxi*. 2008, vol. 5, no. 6, p. 245-248. ISSN 1803-5310.
5. BÁRTŮ, V.: Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Med*. 2007, vol. 9, no. 9, p. 372-373. ISSN 1803-5256.
6. FALZON, D.; INFUSI, A.; BELGHITI, F.: In the European Union, TB patients from the former Soviet countries have a high risk of multidrug resistance. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2006, vol. 10, no. 9, p. 954–958.
7. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Tuberkulóza a respirační nemoci 2014*. Praha: ÚZIS, 2015, 87 p., ISBN 978-80-7472-144-1.
8. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva: World Health Organization. 2015, 192 p., ISBN 9789241565059.
9. PTÁKOVÁ, M.: Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií. *Med. pro praxi*. 2011, vol. 8, no. 11, p. 466-468. ISSN 1803-5310.
10. ZATLOUKAL, P.: Tuberkulóza. *Zdravotnictví a medicína, Příloha: Lékařské listy*. 2007, no. 2. (citováno dne: 19.8.2015) <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/tuberkuloza-287451>
11. KOS, S.: Tuberkulóza dýchacího ústrojí. *Postgraduální medicína*. 2006, no. 6. (citováno dne: 19.8.2015) <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/tuberkuloza-dychaciho-ustroji-280987>
12. BÁRTŮ, V.: Tuberkulóza – současný stav. *Postgraduální medicína*. 2011, no. 6. (citováno dne: 6.9.2015) <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/tuberkuloza-soucasny-stav-460138>
13. HARTL, J.; a kol. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2008, p. 73-124., ISBN 978-80-246-1169-3.
14. TBFACTS – Information about tuberculosis. *TB Drugs – First line, second line & new TB drug*. (citováno dne: 26.9.2015) <http://www.tbfacts.org/tb-drugs/>
15. TRITAR, F.; DAGHFOUS, H.; BEN SAAD, S.; et al.: Management of multidrug-resistant tuberculosis. *Revue de pneumologie clinique*. 2015, vol.71, no 2-3, p. 130-139. ISSN 07618417.
16. MAYO CLINIC: *Diseases and Conditions. Tuberculosis. Treatments and drugs*. 1.8.2014. (citováno dne: 15.10.2015) <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/tuberculosis/basics/treatment/con-20021761>

-
17. LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H.; a kol., *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 2002, p. 460-462, ISBN 80-7262-168-8.
 18. Timmins, G. S.; Deretic, V.: Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology*. 2006, vol. 62 no. 5, p. 1220–1227. ISSN 0950382X.
 19. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M.; *Farmakologie a toxikologie*. 15. vyd., Praha: Grada, 2004, p. 521-526, ISBN 80-247-0836-1.
 20. HOLAS, O.; ONDŘEJČEK, P.; DOLEŽAL, M.: Mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as potential antitubercotics: development in the past decade. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015. vol. 30, no. 4, p. 629-648. ISSN 14756366.
 21. TOSTMANN, A.; BOEREE, M. J.; AARNOUTSE, R. E.; DE LANGE, W. C. M.; VAN DER VEN, A. J. A. M.; DEKHUIJZEN, R.: Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008, vol. 23, no. 2, p. 191-202. ISSN 08159319.
 22. SUCHOPÁR, J.; VALENTOVÁ, Š.; ŠIMEK, R.; a kol., *Remedia compendium*. 4. vyd., Praha: Panax, 2009, 946 p., ISBN 978-80-902806-4-9.
 23. VAN ZYL, L.; DU PLESSIS, J.; VILJOEN, J.: Cutaneous tuberculosis overview and current treatment regiment. *Tuberculosis*. 2015, vol. 95, no. 6, p. 629-638. ISSN 1472-9792.
 24. HASSAN, H. M.; GUO, H.; YOUSEF, B.A.; et. al.: Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. *Journal of applied toxikology*. 2015, vol. 35, no. 12, p. 1427-1432. ISSN 0260437X.
 25. BEN AMAR, J.; DHAHRI, B.; AOUINA, H.; et al.: Tuberculosis treatment. *Revue de pneumologie clinique*. 2015, vol. 71, no. 2-3, p. 122-129. ISSN 0761-8417.
 26. DRUG BANK: *Rifampicin*, 13.06.2005, (17.01.2014, citováno dne: 21.11.2015) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01045>
 27. ESSENTIAL MEDICINES AND HEALTH PRODUCTS INFORMATION PORTAL: *WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Mycobacterial Diseases*. 2015, (citováno dne: 21.11.2015) <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5511e/2.3.html>
 28. BACIEWICZ, A. M.; CHRISMAN, C. R.; FINCH, C. K.; et al.: Update on rifampin, rifabutin, and rifapentine drug interactions. *Current medical research and opinion*. 2013, vol. 29, no. 1, p. 1-12. ISSN 03007995.
 29. VENKATESAN, K. : Pharmacokinetic drug interactions with rifampicin. *Clinical Pharmacokinetics*. 1992. vol. 22, no. 1, p. 47-65. ISSN 03125963.
 30. ESSENTIAL MEDICINES AND HEALTH PRODUCTS INFORMATION PORTAL: *WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Mycobacterial Diseases*. 2015, (citováno dne: 21.11.2015) <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5511e/2.6.html>
 31. ESSENTIAL MEDICINES AND HEALTH PRODUCTS INFORMATION PORTAL: *WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Mycobacterial*

Diseases. 2015, (citováno dne: 21.11.2015)
<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5511e/2.7.html>

32. ALTIPARMAK, U. E.: Toxic optic neuropathies. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2013, vol. 24, no. 6, p. 534-539. ISSN 10408738.
33. EZER, N.; BENEDETTI, A.; DARVISH-ZARGARSKÁ, M.; MENZIES, D.: Incidence of ethambutol-related visual impairment during treatment of active tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2013, vol. 17, no. 4, p. 447-455. ISSN 10273719.
34. KATZUNG, B. G.; a kol: *Základní a klinická farmakologie*. Jinočany: H&H, 2006, p. 714-794, ISBN 80-7319-056-7.
35. ZIGANSHINA, L. E; TITARENKO, A. F.; DAVIES, G.R.: Fluoroquinolones for treating tuberculosis (presumed drug-sensitive). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 1996, no. 6. ISSN 13616137.
36. MOADEBI, S.; HARDER, C. K.; FITZGERALD, M. J.; ELWOOD, K. R.; MARRA, F.: Fluoroquinolones for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Drugs*. 2007, vol. 67, no. 14, p. 2077-2099. ISSN 1179-1950.
37. 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*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013, vol. 288, no. 32, p. 23447-23456. ISSN 1083-351X.
38. DONALD, P. R.; DIACON, A. H.: Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *The Lancet infectious diseases*. 2015, vol. 15, no. 9, p. 1091-1099. ISSN 1473-3099.
39. ZUMLA, A.; NAHID, P.; COLE, S.T.: Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regiment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013, vol. 12, no. 5, p. 388-404. ISSN 1474-1776.
40. KWON, Y. S.; KOH, W. J.: Synthetic investigational new drugs for the treatment of tuberculosis, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2015, vol. 25, no. 2, p. 183-193. ISSN 1744-7658.
41. STEHR, M.; ELAMIN, A. A.; SINGH, M.: Filling the Pipeline - New Drugs for an Old Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 14, no. 1, p. 110-129. ISSN 1873-5294.
42. CHAHINE, E. B.; KARAOUI, L. R.; MANSOUR, H.: Bedaquiline: A Novel Diarylquinoline for Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Annals of Pharmacotherapy*. 2014, vol. 48, no. 1, p. 107-115. ISSN 1542-6270.
43. VAN HEESWIJK, R. P. G.; DANNEMANN, B.; HOETELMANS, R. M. W.: Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014, vol. 69, no. 9, p. 2310-2318. ISSN 1460-2091.

-
44. RUSTOMJEE, R.; ZUMLA, A.: Delamanid expanded access novel treatment of drug resistant tuberculosis. *Infection and Drug Resistance*. 2015, vol. 8, p. 359-366. ISSN 11786973.
 45. SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X.; YUAN, H.; LEE, J. S.; BARRY, C. E., III; WANG, H.; ZHANG, W.; ZHANG, Y., Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2011, vol. 333, no. 6049, p. 1630-1632. ISSN 00368075.
 46. DOLEŽAL, M.: Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu. *Chemické listy*. 2006, vol. 100, p. 959-966. ISSN 1213-7103.
 47. ZHANG Y.; MITCHISON D.: The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2003, vol. 7, no. 1, p. 6-21. ISSN 10273719.
 48. NGO, S. C.; ZIMHONY, O.; CHUNG, W. J.; SAYAHI, H.; JACOBS JR, W. R.; WELCH, J. T.: Inhibition of Isolated Mycobacterium tuberculosis Fatty Acid Synthase I by Pyrazinamide Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 7, p. 2430–2435. ISSN 00664804.
 49. SAYAHI, H.; PUGLIESE, K. M.; ZIMHONY, O.; JACOBS, W. R., JR.; SHEKHTMAN, A.; WELCH, J. T.: Analogs of the Antituberculous Agent Pyrazinamide Are Competitive Inhibitors of NADPH Binding to M. tuberculosis Fatty Acid Synthase I. *Chemistry & Biodiversity*. 2012, vol. 9, no. 11, p. 2582-2596. ISSN 16121872.
 50. ZHANG, Y.; WADE, M. M.; SCORPIO, A.; ZHANG, H.; SUN, Z.: Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, vol. 52, no. 5, p. 790-795. ISSN 03057453.
 51. SHI, W.; CHEN, J.; FENG, J.; CUI, P.; ZHANG, S.; WENG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y., Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Microbes & Infections*. 2014, vol. 3, no. 8, e58. ISSN 22221751.
 52. HAYES, B. L.: *Microwave synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. Matthews: CEM Publishing, 2002, p. 11-19. ISBN 0-9722229-0-1.
 53. LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESMAN, J.: Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*. 2001, vol. 57, no. 52, p. 9225-9283. ISSN 00404020.
 54. WORZAKOWSKA, M.: Microwave-Assisted Synthesis of Cinnamyl Long Chain Aroma Esters. *Molecules*. 2015, vol. 20, no. 6, p. 10594-10603. ISSN 14203049.
 55. ROSA, M. D.; GISING, J.; ODELL, L. R.; LARHED, M.: Syntheses of new tuberculosis inhibitors promoted by microwave irradiation. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2014, vol. 119, no. 2, p. 181-191. ISSN 03009734.
 56. SAUDI, M.; ZMURKO, J.; KAPTEIN, S.; ROZENSKI, J.; NEYTS, J.; VAN AERSCHOT, A.: Synthesis and evaluation of imidazole-4,5- and pyrazine-2,3-dicarboxamides targeting dengue and yellow fever virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 87, p. 529-539. ISSN 02235234.

-
57. VAUGHAN, G.; ROSE, J. C.; BROWN, G. P.: Polyimides based on pyrazinetetracarboxylic dianhydride and some related model compounds. *Journal of Polymer Science*. 1971, vol. 9, no. 4, p. 1117-1138. ISSN 0449296X.
58. FERREIRA BISPO, M. L.; BORGES GONCALVES, R. S.; DA SILVA LIMA, C. H.; et al.: Synthesis and Antitubercular Evaluation of N-Arylpyrazine and N,N'-Alkyl-diylpyrazine-2-carboxamide Derivatives. *Journal of heterocyclic chemistry*. 2012, vol. 49, no. 6, p. 1317-1322. ISSN 0022152X.
59. YAJKO, D. M.; MADEJ, J. J.; LANCASTER, M. V.; SANDERS, C. A.; CAWTHON, V. L.; GEE, B.; BABST, A.; HADLEY, W. K: Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995, vol. 33, no. 9, p. 2324-2327. ISSN 00951137.
60. SERVUSOVÁ, B.; VOBICKOVÁ, J.; PATEROVÁ, P.; KUBÍČEK, V.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.: Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, vol. 23, no. 12, p. 3589-3591. ISSN 0960894X.
61. 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, no. 1, p. 174-183. ISSN 09680896.
62. SALFINGER, M.; HEIFETS, L.B.: Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1988, vol. 32, no. 7, p. 1002-1004. ISSN 00664804.
63. MACKERELL, A.; ZHANG, H.; OSTERMAN, A.; KOLHATKAR, R.: Benzylidenehydrazine derivatives as bacterial NadD inhibitors and their preparation and use for the treatment of bacterial infection. *International application published under the patent cooperation treaty*. WO 2011/006158 A2. 13.01.2011.
64. SIMOES, M. F.; VALENTE, E.; RODRIGUEZ-GOMEZ, M. J. et al.: Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs Stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2009, vol. 37, no. 3-4, p. 257-263. ISSN 0928-0987.
65. BERGMANN, K. E.; CYNAMON, M. H.; WELCH, J. T. Quantitative structure-activity relationships for the in vitro antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters. *Journal of medicinal chemistry*. 1996, vol. 39, no. 17, p. 3394-3400. ISSN 0022-2623.