

**UNIVERZITA KARLOVA**  
***FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ***  
**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE**  
**A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY**



**SLOUČENINY KOMBINUJÍCÍ FRAGMENT PYRAZINAMIDU**  
**A *P*-AMINOSALICYLOVÉ KYSELINY**  
**JAKO POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA II**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Ondřej Žák

## Poděkování

Velmi rád bych poděkoval vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za pomoc, ochotu a profesionální vedení při vypracovávání této diplomové práce. Dále bych rád poděkoval všem, kteří se podíleli na biologickém a chemickém testování nových sloučenin. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za podporu.

Děkuji i za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 401) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt C-C3/1572317).

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

Ondřej Žák

V Hradci Králové, květen 2018

# Obsah

1 Seznam použitých zkratk	5
2 Cíl diplomové práce	8
3 Teoretická část	9
3.1 Tuberkulóza – obecné informace	9
3.2 Původce onemocnění – Mycobacterium tuberculosis	10
3.3 Patofyziologie TBC	11
3.4 Epidemiologie onemocnění – svět a ČR	12
3.5 Aktivní imunizace proti TBC	13
3.6 Diagnostika TBC	14
3.7 Rezistence TBC	15
3.8 Léčebný režim TBC	18
3.8.1 Léčiva I. linie	19
3.8.2 Léčiva II. linie	24
3.8.3 Nová léčiva a budoucnost terapie TBC	29
4 Experimentální část	31
4.1 Použité chemikálie, přístroje a metody	31
4.2 Syntéza výchozích látek	32
4.3 Syntéza finálních produktů	34
4.3.1 Postup přípravy jednotlivých derivátů substituované 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny	35
4.4 Nově připravené látky	39
4.5 Biologické testování látek	54
4.5.1 Antimykobakteriální aktivita sloučenin	54
4.5.2 Antifungální aktivita sloučenin	57
4.5.3 Antibakteriální aktivita sloučenin	58
5 Diskuze	59
6 Závěr	62
7 Abstrakt	63
8 Abstract	64
9 Seznam použité literatury	65

# 1 Seznam použitých zkratk

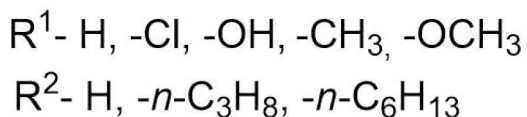
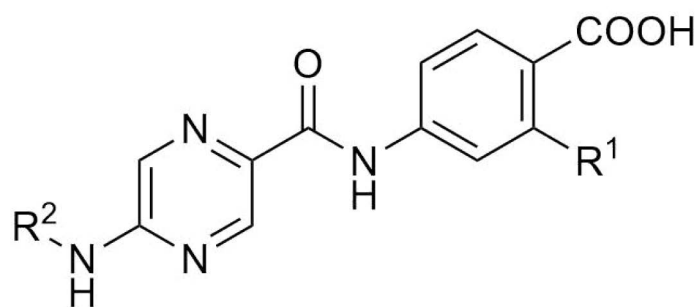
AcOH	kyselina octová
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AMK	aminokyselina
AT	antituberkulotikum
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacil Calmette – Guérin
BK	bacil Kochův
CaB	blokátor vápníkových kanálů
CD4+ a CD8+	efektorové T-lymfocyty
CNS	centrální nervová soustava
CYP450	cytochrom P450
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTS	režim plně kontrolované léčebné péče
EIS protein	<i>enhanced intracellular survival protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EMB	etambutol
EtOAc	ethyl-acetát
FAS	syntáza I mastných kyselin
FAS-II	syntáza II mastných kyselin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GIT	gastrointestinální (trakt)

HCl	kyselina chlorovodíková
HepG2	lidské buněčné linie rakoviny jater
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
i.m.	intramuskulární
IČ	infračervené
IGRA	<i>Interferon gamma release assay</i>
IL2	interleukin 2
INF $\gamma$	interferon gama
INH	isoniazid
ISBT	Informační systém bacilární tuberkulózy
KatG	enzym kataláza/peroxidáza
KFCHFA	Katedra farmaceutické chemie a analýzy léčiv
LL	léčivá látka
log <i>P</i>	rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda
LP	léčivý přípravek
M.	<i>Mycobacterium</i>
M.tbc	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAO	enzym monoaminoxidáza
MBM	molekulárně biologické metody
MDR-TB	multirezistence
MeOH	methanol
MfpA	<i>Mycobacteria FQ resistance protein A</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	<i>messenger</i> ribonukleová kyselina
MTD	proces, kdy k hledanému úseku NK vytvoříme komplementární genetickou sondu ( <i>Mycobacterium tuberculosis Direct Test</i> )
MÚ	mechanismus účinku
NAD <sup>+</sup> / NADH	Nikotinamidadenin dinukleotid – oxidovaná a reduková forma
NK	nukleová kyselina
NMR	spektroskopie nukleární magnetické resonance

NO	oxid uhelnatý
PAS	kyselina <i>para</i> -aminosalicylová
PBP	penicilin vázající proteiny
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE11	enzym – lipáza/transferáza
PNS	periferní nervová soustava
PPD	<i>purified protein derivative</i>
PRC	Čínská lidová republika
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RpsA	ribosomální protein S1
rRNA	ribosomální RNA
RR-TB	rifampicin rezistentní tuberkulóza
RTG	rentgen
R-U	Rakousko – Uhersko
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TBC	tuberkulóza
TCA	tricyklická antidepresiva
TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
Th1	pomocné T-lymfocyty
THA	thiacetazon
TLC	tenkovrstvá chromatografie
tmRNA	transfer-messenger RNA
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor alfa
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná (spektroskopie)
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza

## 2 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce je syntéza derivátů 4-(5-aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny či strukturně podobných derivátů s potenciální antimykobakteriální či jinou antibakteriální a antifungální aktivitou. Dříve připravená kyselina 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová vykazovala selektivní aktivitu proti *M. tbc* H37Rv. Její alkylamino deriváty v poloze 5 pyrazinového jádra pak vykazovaly výrazně nižší cytotoxicitu na HepG2 buňkách <sup>1</sup>. Jedná se tedy o derivát pyrazinamidu a kyseliny *p*-aminosalicylové. Pyrazinamid je řazen mezi antituberkulotika I. linie. Kyselina *p*-aminosalicylová (PAS) pak patří mezi antituberkulotika II. linie, kdy využívá výhodné vlastnosti založené na podobnosti s kyselinou *p*-aminobenzoovou, a tedy interferuje s metabolickou cestou tvorby folátů v mykobakteriích <sup>2</sup>.



Nejprve bude nutné vypracovat rešeršní část práce se zaměřením na vztah struktura účinek u nám již známých látek s antimykobakteriální aktivitou. Díky těmto poznatkům pak budou navrženy finální struktury našich sloučenin pro experimentální část práce. V experimentální části se zaměříme hlavně na antimikrobní aktivitu našich látek společně s metodou jejich laboratorní syntézy, což bude hlavním bodem diplomové práce.

Sloučeniny budou charakterizovány spektry jako IČ spektrum, NMR, dále bude změřena teplota tání či v neposlední řadě provedena elementární analýza. Definujeme vztah struktura – účinek nově vzniklých sloučenin a tyto výsledky celé série produktů pak na závěr diplomové práce budou prodiskutovány.



## 3 Teoretická část

### 3.1 Tuberkulóza – obecné informace

Tuberkulóza (TBC), jako infekční onemocnění způsobené obligátně patogenní bakterií *Mycobacterium tuberculosis* <sup>3</sup>, zůstává po dlouhá desetiletí globálním problémem našeho rychle se rozvíjejícího světa. Bakterie napadá nejčastěji plic (pulmonální tuberkulóza), dokáže se však rozšířit i na jiné orgány (extrapulmonální TBC). Nákaza se nejlépe mezi postiženými přenáší vzduchem, resp. kašlem nakaženého. Pouze u malého procenta populace nakažené *Mycobacterium tuberculosis* se projeví tuberkulóza během jejich života – jedná se asi o 5 % <sup>4</sup>. Mnohem větší šanci infekce TBC pak mají polymorbidní pacienti trpící ať už AIDS <sup>5</sup> či diabetem a jinak imunokompromitovaní pacienti, mezi další rizikové faktory pak samozřejmě patří i malnutrice, kouření či abúzus omamných látek.

Podle zprávy World Health Organization (WHO) onemocní TBC 10 milionů nových pacientů každý rok, kdy majoritní podíl tvoří lidé z rozvojových zemí (95 %) a toto onemocnění je zařazeno mezi deset nejčastějších příčin úmrtí. Do roku 2035 se plánuje snížit počet nově nakažených TBC o 90 %, i z tohoto důvodu se v Moskvě uskutečnila v listopadu 2017 Ministerská konference, jejímž tématem bylo právě snížení incidence nových případů TBC do již zmiňovaného roku 2035. V České republice jsme za rok 2016 zaznamenali 511 nových případů nakažených <sup>4</sup>.

První zdokumentovaný případ nakažení *Mycobacterium tuberculosis* se váže k 17 000 let starému exempláři bizona nalezeném v americkém státě Wyoming, pomocí Polymerázové řetězové reakce (PCR metody) byly bakteriální bílkoviny *Mycobacteria* nalezeny v kostních lézích <sup>6</sup>. U člověka je pak první případ zaznamenán asi před 9000 lety u dítěte a ženy, jež se nakazili ve východním Středomoří <sup>7</sup>. TBC lákalo vědce již od samotného starověku – *phthisis*, jak ji pojmenoval samotný velký Hippokrates, či *cunsumptio* v podání římského rétora a politika Cicera. Podle Hippokrata je pak pojmenována celá věda zabývající se TBC tzv. ftizeologie <sup>8</sup>. I když je samotný původce, pojmenován jako Kochův bacil, název této nemoci odvodil Johann Lukas Schönlein v roce 1834 vzhledem k uzlíkům a granulomům vytvářejících se u všech forem onemocnění. V roce 1882 pak Robert Koch objevil původce onemocnění, o rok později je pak samotná bakterie pojmenována. Za tento úžasný objev je mu pak udělena v roce 1905 Nobelova cena za fyziologii nebo lékařství <sup>9</sup>.

Největším problémem této bakterie je skutečnost, že mnoho kmenů je již multirezistentních – prudký nárůst jsme zaznamenali od konce 80. let 20. století do roku 2014 <sup>10</sup>. Kromě plic dokážou napadnout i jiné orgánové systémy jako mízní uzliny či urogenitální trakt. WHO deklaruje, že jejím primárním cílem bude do roku 2035 omezit počet nově nakažených TBC společně se snížením úmrtnosti na toto zákeřné globální onemocnění - 95% redukce úmrtnosti a 90 % snížení incidence TBC oproti referenčnímu roku 2015 <sup>4</sup>.

## 3.2 Původce onemocnění – *Mycobacterium tuberculosis*

Bakterie *Mycobacterium tuberculosis* patří společně s *Bacillus calmette-guérin* (BCG) a *M. africanum*, které vlastně tvoří jakýsi pomyslný přechod mezi *M. tuberculosis* a *M. bovis*, do skupiny souhrnně nazvané komplex *M. tuberculosis*. Tento bacil Kochův (BK) zařazujeme mezi acidoresistentní nepohyblivé nesporulující tyčky a v podstatě je nelze barvit metodou dle Grama kvůli vysokému obsahu lipidů, zejména vosku v bakteriální stěně. Jsou zařazeny do skupiny acidorezistentních tyček, protože po zbarvení za horka není možné tuto bakterii odbarvit alkoholem ani se směsí HCl. *M. tuberculosis* se proto barví klasicky pomocí metody Ziehla – Neelsena<sup>11</sup> nebo fluorescenčně.

Stavba v podstatě odpovídá typickým G<sup>+</sup> tyčkám, protože na peptidoglykanu jsou navázány mykolové kyseliny o délce až 90 uhlíků. Morfologicky bakterii zařazujeme do řádu *Actinomycetales*, čeledi *Mycobacteriaceae* a rodu *Mycobacterium*<sup>12</sup>. Pro druhy *M. tuberculosis* a *M. leprae* je typické, že osidlují tkáně člověka a jiných teplokrevných živočichů oproti většině druhů z tohoto kmene, kteří jsou považováni za saprofyty<sup>3</sup>.

Mykobakterie se vyznačují velmi dlouhou generační dobou, která činí až 24 hodin a pěstují se při teplotě kolem 37 °C po dobu až šesti týdnů. Závisí na složení půdy a teplotě při kultivaci. Je zajímavostí, že *M. leprae* se dokonce nepodařilo vypěstovat mimo živé buňky<sup>3</sup>. Nesporná vývojová výhoda je fakt, že tyto bakterie si vypěstovaly odolnost na vysychání, vyšší teploty (do 60 °C) i chemické látky. Za běžných okolností jsou mykobaktéria tuberkulózy životaschopná ve vnějším prostředí po dobu 1–2 hodin, sluneční svit a teploty vyšší 60 °C vedou k uhynutí. Ve sputu se tato bakterie udrží životaschopná dokonce až 8 měsíců<sup>13</sup>, v prachu pak necelé dva týdny<sup>3</sup>.

Mezi další zástupce rodu *Mycobacterium* patří mezi jinými *Mycobacterium bovis*, které je velmi patogenní hlavně pro domácí zvířata jako skot, králíci či morčata. V minulosti hrozila nákaza člověka hlavně vypitím mléka, jež neprošlo procesem pasterizace, které však vyvolalo spíše tuberkulózu části lymfatického systému než exacerbaci plicního onemocnění<sup>14</sup>. León Calmette společně s Camille Guérinem pak pasážovali tuto acidorezistentní tyčku odebranou z vemena nakažené krávy TBC na bramborovou půdu, což způsobilo ztrátu virulence. Vytvořili kmen, jenž dal později vzniknout tzv. BCG vakcíně<sup>15</sup>.

*Mycobacterium leprae* pak způsobuje lepru, jinak řečeno malomocenství, které zvláště v dobách středověku prakticky vyčlenilo nemocného z fungující společnosti do jakýchsi ghett. Pacienta postiženého leprou poznáme podle určitých znaků<sup>16</sup>:

- hypopigmentovaných lézí na pokožce se sníženou citlivostí
- postižení periferní nervové soustavy (PNS)- anhidróza, slabost horních a dolních končetin, ztráta citu
- výskytu viditelných deformací
- demonstrováných příznaků choroby, mikrobiologicky potvrzených původců ze stěru z pokožky

Jiné atypické mykobakteriózy jsou pak schopny vyvolat druhy *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* či *Mycobacterium xenopi*. Zajímavým druhem je určitě i *Mycobacterium marinum* schopné vyvolat tzv. plovárenský granulom (postižený se nakazí odřením o stěnu bazénu). Burulský vřed pak vyvolává patogen *M. ulcerans*, který je endemitem až ve 30 afrických zemích<sup>17</sup>. Jedná se o nodální útvar, kdy bakterie vytváří mykolakton, který destrukuje zdravou tkáň, a navíc inhibuje vlastní imunitní odpověď organismu.

### 3.3 Patofyziologie TBC

Nejčastější metodou nákazy je přenos kapénkovou infekcí od postiženého jedince, bakterie do systému nejčastěji vstupuje přes plicní alveoly, kůži nebo trávicí trakt. V první fázi nákazy dochází k fagocytóze makrofágy, kdy *Mycobacterium* je schopno přežít uvnitř makrofága. Při styku s T lymfocytom dochází k aktivaci imunitní reakce a zvýšené produkci Th1 buněk. Tyto buňky pak produkují IL2 a INF $\gamma$ , které aktivují další makrofágy, chemotakticky jsou zde přitahovány další monocyty. Následně se monocyty přetvářejí na makrofágy, které se potom mění na epitheloidní buňky či mnohojaderné Langhansovy buňky, ze zdravé orgánové tkáně se vytváří granulom – primární ložisko. Tyto aktivované makrofágy bohužel ničí i okolní zdravou tkáň.<sup>18</sup> Z primárního komplexu (primární ložisko společně s lymfatickou uzlinou) se pak infekce šíří i do ostatních orgánů. Tyto léze se následně hojí, opouzdřují se vrstvou fibrinu a kalcifikují se. Větší léze, především ty opouzdřené vazivem, pak zůstávají místem, kde může dojít k opětovné progresi. Zde pak končí primární infekce, která se nejčastěji odehrává v dětském věku<sup>3</sup>.

Sekundární infekce pak nastává po reaktivaci tuberkulózního ložiska v řádu i několik desítek let. Nejčastějším spouštěčem je, jak již bylo zmíněno na začátku diplomové práce, určitě oslabení imunity – ať už se jedná o HIV, abúzus alkoholu či drog a malnutrice. Výsledkem opětovného nastartování choroby je tuberkulom, který může kolikvovat a následně se vyprázdnit přímo do bronchů<sup>4</sup>. Ve vzniklém prostoru už nic nebrání radikálnímu namnožení bakterie. Destrukce plicní tkáně je pak doprovázena hemoptýzou s uvolněním TNF  $\alpha$ , který způsobí signifikantní zvýšení tělesné teploty<sup>18</sup>.

Mezi rizikové faktory, které určitým způsobem ovlivňují průběh a délku choroby TBC, můžeme zařadit<sup>19</sup>:

- a) Osoby, které žijí ve špatných socioekonomických podmínkách – bezdomovci, azylantí, nezaměstnaní
- b) Přidružená onemocnění – HIV (riziko je dokonce až 200krát větší), akutní virové infekce, malnutrice, nedostatek vitamínu D, chronická jaterní a ledvinná onemocnění, hematologické malignity a diabetes mellitus
- c) Iatrogenní vlivy – aplikace imunopresiv a léků ovlivňující buněčnou složku imunity
- d) Délku expozice – nahodilá vs. protražovaná expozice
- e) Pohlaví – do 30 let je vyšší prevalence mezi ženami, poté se poměr obrací

- f) Věk – do 5 let hrozí spíše tuberkulózní meningitida, v pubertě pouze lokální komplikace TBC, u lidí v důchodovém věku je pak větší riziko z důvodu oslabení imunitního systému.

### 3.4 Epidemiologie onemocnění – svět a ČR

Je poměrně zajímavé, že epidemiologické vlny tuberkulózy se zaznamenávají už skoro 300 let. TBC přicházela po staletí ve vlnách s pozvolným poklesem incidence nemocných. Důležitými ukazateli pak jsou incidence, prevalence, recidiva TBC a riziko infekce. Již od dob dávno minulých až do dnešních dní se sleduje mortalita jako absolutní hodnota nebo mortalita vztažená na zlomek obyvatelstva (100 tis. obyvatel) <sup>19</sup>.

Tuberkulóza je považována za devátou nejčastější globální příčinu úmrtí. Přibližně jedna třetina světové populace je touto nemocí promořena. Podle dostupných dat zemřelo v roce 2016 1,3 milionů lidí na toto onemocnění. Nesmíme zapomenout započítat i 374 000 mrtvých HIV pozitivních lidí. U 10,4 milionů lidí propuklo toto onemocnění v aktivní formě, 56 % z tohoto celku žilo v pěti zemích: Indie, Indonésie, Čína, Filipíny a Pákistán. V tomto roce bylo zaznamenáno i 6,3 milionů nových případů TBC (zaznamenali jsme nárůst o 0,2 milionů oproti roku 2015). Globální úmrtnost (vztažena na 100 000 obyvatel) klesla o 37 % od začátku našeho milénia. Za regiony, ve kterých nejvíce klesla míra úmrtnosti, pak můžeme považovat Evropu (o 6,0 %) a západní Tichomoří (4,6 %) od roku 2010 <sup>4</sup>.

Čínská lidová republika patří do pěti nejvíce ohrožených zemí. V citované studii <sup>20</sup> jsme zaznamenali prudký nárůst incidence TBC od roku 1992 (9/ 100 000 případů) v Chongqing (PRC) do vrcholu v roce 2005 (106/ 100 000 případů). Tento prudký nárůst můžeme vysvětlit především implementací strategie Directly observed treatment (TB – DOTS) do národních legislativ. Jedná se o strategii boje proti TBC vypracovanou WHO – ochrana a monitoring pracovníků po dobu alespoň 2 měsíců, distribuce LP, mikrobiologická detekce patogenu ze sputa. Před implementací DOTS se případy tuberkulózy nehlásily, proto počet případů zdánlivě narostl. Prevalence onemocnění nyní v této lokalitě zaznamenává sestupnou tendenci, v rozmezí let 1990–2010 došlo ke snížení o 60 %.

Z historického hlediska byla tuberkulóza hroživou chorobou pro všechny české země bývalého Rakouska – Uherska (R-U). Při prvním epidemiologickém šetření vyšla míra úmrtnosti 360/ 100 000 obyvatel (v Praze dokonce 400/100 000 obyvatel). V období mezi světovými válkami se pak o celospolečenskou osvětu a péči o nakažené starala Masarykova liga proti tuberkulóze (založena 1919). V roce 1940 ještě běžně umíralo 140 ze 100 000 obyvatel <sup>19</sup>. ČR patří mezi země, která má nastaven systém kvalitní kontroly TBC. V roce 2011 jsme získali hlášení o 609 nových případech (5,8/100 000 obyvatel). Je zde zaznamenán určitý pokles oproti roku 2010 o 71 případů. Nepotvrdily se tedy prognózy, že po zrušení plošné vakcinace dojde k prudkému nárůstu incidence TBC. Za rizikové skupiny zde v ČR můžeme považovat bezdomovce a imigranty, kteří pocházejí ze zemí ohrožených TBC <sup>21</sup>.

V roce 2016 bylo nahlášeno celkem 517 případů onemocnění tuberkulózou všech forem a lokalizací, tj. 4,9 případu na 100 000 obyvatel. Oproti roku 2015 jsme zaznamenali o jediný případ méně. Z dlouhodobého hlediska vykazuje počet onemocnění TBC u nás trvale klesající trend a v mezinárodním měřítku se můžeme pyšnit skoro nejnižší prevalencí. Mezi nemocnými bylo 28 osob již dříve léčených antituberkulotiky. Muži převažují, jedná se o 70 % všech nemocných. Dlouhodobě nejvyšší počty nemocných vykazuje hlavní město Praha: 105 (8,3/100 000 obyvatel). Naopak nejnižší počet nemocných vzhledem k počtu obyvatel byl v Jihočeském kraji: 11 (1,7/100 000 obyvatel). V registru jsme za rok 2016 zaznamenali celkově 22 úmrtí na TBC, nejvyšší počet úmrtí (5 případů) byl v Praze <sup>22</sup>.

### 3.5 Aktivní imunizace proti TBC

V komunistickém Československu byl milníkem rok 1953, kdy bylo zavedeno povinné očkování, čímž byla snížena prevalence závažných forem tuberkulózy převážně u dětí. Po Sametové revoluci pak byl v ČR zaveden Registr tuberkulózy a Informační systém bacilární tuberkulózy (ISBT), volně navazuje na zákonnou povinnost lékařů hlásit nové případy nemocných. V roce 2009 se následně zrušila opakovaná vakcinace jedenáctiletých dětí, od roku 2010 se pak očkují BCG vakcínou pouze rizikovní novorozenci <sup>19</sup>. Rozhodnutí, zda očkovat či neočkovat novorozence, je pak na praktickém lékaři pro děti a dorost po vyhodnocení tzv. Dotazníku k definici rizika tuberkulózy, který se vyplňuje s přítomným zákonným zástupcem dítěte.

Cílená vakcinace novorozenců (4 dny- 6 měsíců) je pak doporučena v těchto případech:

- člen rodiny prodělal anebo stále má toto onemocnění
- samotné dítě nebo člen rodiny pobýval ve státech s prevalencí vyšší než 40/100 000 obyvatel déle než čtvrt roku
- byl zaznamenán kontakt s nemocným
- podklady pro očkování vychází z osobní anamnézy dítěte <sup>23</sup>

V dnešní době se pro potřeby očkování používá BCG vakcína pojmenována po jejich objevitelích – León Calmette společně s Camille Guérinem. Celá historie BCG vakcíny se začala psát na začátku 20. století ve francouzském Lille. Na tamějším Institut Pasteur de Lille pasážovali *Mycobacterium bovis* na bramborovou půdu s glycerinem, pro ztrátu virulence tohoto druhu byla později přidána hovězí žluč. V roce 1919 po bezmála 11 letech pasážování vytvořili tito pánové oslabený kmen, který po vpravení do těla hostitele nevyvolával progresivní tuberkulózu. O dva roky později byla vakcína aplikována těhotné ženě (první očkování člověka) nakažené tuberkulózou, která po porodu sice zemřela, ale porodila zdravé dítě. Později v téže roce pánové Weill-Halle a Turpin podali dávku BCG perorálně malému dítěti, u pacienta se nevyskytly žádné nežádoucí účinky po perorálním podání <sup>15</sup>.

Díky plošnému očkování (dnes již vysoce selektivní) se nám v českých zemích podařilo snížit prevalenci onemocnění na historické minimum. Reakcí na očkování je vznik

postvaccinační léze, která je vlastní reakci na vpich. Samotný pupínek je potvrzením aktivní imunizace daného jedince. Do tří měsíců by se měl úplně zhojit. Větší lokální abscesy se pak objevují spíše u malých dětí. V případě výskytu lokálních nežádoucích účinků léčba spočívá v topické aplikaci Framykoinu® (bacitracin + neomycin). Úspěšnost očkování se pak prověří tuberkulinovou zkouškou, která se provádí po třech měsících od očkování. Je-li zkouška negativní (plochá léze, bez erytému a infiltrace, menší než 5 mm), BCG vakcinace se následně opakuje.

Mezi nejčastější systémové reakce na vakcinaci pak můžeme zařadit zvětšení regionálních lymfatických uzlin – hlavně těch axilárních, vzácněji se pak mohou objevit lymfadenopatie, osteomyelitida, hepatosplenomegalie a artritida.

Pacienti by se neměli nechat očkovat při známé alergické reakci na očkování, pokud právě prodělávají horečnaté onemocnění nebo je jejich tuberkulinová zkouška pozitivní. Vyhnout očkování by se měly i těhotné či kojící ženy anebo imunokompromitovaní pacienti. Jedná se především o HIV – pozitivní, pacienty trpící hemoblastózou, pacienty léčené kortikosteroidy či jinými imunosupresivy a pacienty s poškozením eliminačních orgánů<sup>24, 25</sup>.

### 3.6 Diagnostika TBC

Lékař spolu s klinickým mikrobiologem přesně stanoví anamnézu, určí správně agens, nechají provést rentgen plic společně s biochemickými a hematologickými testy. Pro správnou diagnostiku této choroby je potřeba odebrat kvalitní biologický vzorek a tento vzorek odeslat podle Vyhlášky č. 306/2012 Sb. do testovací laboratoře v chladicích boxech<sup>26</sup>. U plicních forem se odebírá sputum v nejlepším případě před jídlem, provádí se bronchoalveolární laváž a testuje se výpotek z pleury. Pokud existuje riziko, že *Mycobacterium* způsobilo meningitidu, odebírá se a testuje mozkomíšni mok. Při testování výskytu TBC v urogenitální oblasti odebíráme střední proud moči<sup>27</sup>, žaludeční obsah je naopak odebírán nalačno se zvýšeným rizikem neutralizace vzorku, proto musí být dopraven na místo testování nejlépe do čtyř hodin. Stolice s podezřením na výskyt *Mycobacterium* je pak odesílána ve sterilních nádobách. K mikrobiologickému vyšetření jde odeslat stěr z lézí, píštělí či hnisavých oblastí. Mikrobiologický materiál může být odeslán i v injekční stříkačce, kterou byl právě odebrán<sup>28</sup>.

V mikrobiologické laboratoři se *Mycobacteria* stanovují klasicky pomocí mikroskopu a kultivačního nálezu, modernějším způsobem diagnostiky je pak využití molekulárně biologických metod (MBM). Tyto acidorezistentní tyčky jsme schopni stanovit v nativním preparátu po fluorescenčním barvení, méně častěji se pak využívá metoda podle Ziehl – Neelsena. Kultivace na živných půdách je pak metodou časově náročnou – trvá až devět týdnů<sup>29</sup>. Modernější metody založené na detekci produktů metabolismu mykobakterií (BacT/ALERT) či na detekci množství spotřebovaného kyslíku (Bactec) pak trvají kratší dobu – na výsledek se čeká asi šest týdnů<sup>30</sup>.

K průkazu TBC podle nejnovějších používaných metod pak stačí pouze několik hodin. Tyto moderní metody jsou založeny na detekci určitých částí nukleových kyselin (NK)

specifických pro danou acidorezistentní tyčku. Jedná se přesněji řečeno o *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD testy) a PCR metodu. Principem těchto metod je proces, kdy k hledanému úseku NK vytvoříme komplementární genetickou sondu<sup>31</sup>. Tato metoda je schopna detekovat i neživá *Mycobacteria*, která již ztratila svou virulenci, proto se následně musí provést i klasické kultivační vyšetření trvající 6–9 týdnů. Narostlá *Mycobacteria* jsou pak identifikována pomocí sekvenční analýzy a jsme tedy schopni rozlišit jednotlivé druhy, případně další netuberkulózní mykobakterie.

Histologické vyšetření je považováno za esenciální – jsme schopni určit, zda probíhá granulomatozní zánět (Langansovy buňky, kaseinizace tkáně). Pro komplexní laboratorní vyšetření je nutné testovat bakterii i na resistenci vůči antituberkulotikům I., příp. II. řady.

Nepřímé diagnostické metody se pak používají k určení stavu specifické (buněčné) imunity testovaného jedince. U každého jedince se kromě tuberkulinového testu provádí i tzv. IGRA testy, pomocí nichž prokazujeme interferon gama (INF- $\gamma$ ), jenž je produkován některými druhy lymfocytů po kontaktu s *M. tuberculosis*. Jedním z nejčastěji používaných je QuantiFERON®-TB Gold, který funguje na principu produkce již zmiňovaného interferonu gama (INF $\gamma$ ) efektorovými T-lymfocyty (CD4+ a CD8+) po jejich stimulaci *in vitro* peptidovými antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB-7.7. Krev se nechá 1 den inkubovat ve zkumavce s antigeny TBC, ve zkumavce s mitogenem MIT a v kontrole NIL (jedná se v podstatě o hladinu INF- $\gamma$  přítomna v testovaném organismu). Produkce INF $\gamma$  je pak stanovována pomocí metody ELISA<sup>32</sup>. Novinkou na trhu je poté i přesnější provedení této metody – QuantiFERON®-TB Gold Plus, která rozlišuje produkci INF $\gamma$  dvěma druhy lymfocytů ve dvou zkumavkách TB1 a TB2. Kvantifikuje se na dva stejné antigeny- ESAT-6 a CFP-10. Zkumavka TB1 pak zkoumá imunitní odpověď CD4+ pomocných lymfocytů, TB2 slouží ke zjištění odpovědi CD8+ cytotoxických lymfocytů. Provedení metody i výsledné hodnocení je obdobné jako u QuantiFERON®-TB Gold<sup>33</sup>. Zde zmiňované testy jsou typické pouze pro komplex *M. tuberculosis*, z atypických mykobakterií komplex obsahuje *M. marinum*, *M. kansasii*, a *M. szulgai*. U ostatních mykobakterií, včetně *M. bovis* BCG, tyto antigeny přítomny nejsou. Negativní výsledek metody neznamená, že pacient ne onemocněl<sup>33</sup>.

Tuberkulinový test (Mantoux reakce) pak představuje reakci pozdní přecitlivělosti na PPD (imunopatologická reakce IV. typu) z vybraných kmenů mykobakterií. Test se hodnotí po 72 hodinách, kdy za pozitivní výsledek se považuje zmnožení vaziva o více jak 5 mm. Pozitivní výsledek nastává obvykle po aplikaci BCG vakcíny, nakažení se TBC anebo z neznámých důvodů. U imunokompromitovaných pacientů (HIV – pozitivní) a u pacientů, kteří onemocní v pozdějším věku, může test vycházet naopak negativně<sup>34</sup>.

### 3.7 Rezistence TBC

Citlivost na zvolené antituberkulotikum je důležitá vlastnost pro určení původce onemocnění a samotné terapie postiženého „na míru“. V populaci těchto acidoresistentních tyček se vyskytuje přirozená (primární) rezistence v poměru jedna rezistentní mutanta na 1 000 000 citlivých mutant. Primární rezistence znamená, že pacient nereaguje

na podané antituberkulotikum, přestože nebyl dosud léčen. V ČR se jedná maximálně o 2 % případů v izolovaných kmenech<sup>19</sup>. Pokud mluvíme o resistenci sekundární, jedná se o stav, kdy bakterie přestala být citlivá na antituberkulotikum až během poskytnuté léčby. Důvodem sekundární resistance je jak špatně nastavený léčebný plán lékařem, tak i non-adherence a non-compliance pacienta. V rozvojových zemích se totiž většinou neprovádějí testy citlivosti kmene na zvolený LP.

Nejzávažnější druhy sekundární resistance jsou tyto<sup>4</sup>:

- a) MDR-TB (multiresistence)- necitlivost na rifampicin a izoniazid (AT I.volby)
- b) XDR-TB (extenzivně resistantní tuberkulóza) - kmen není navíc citlivý na AT II. volby (amikacin, kapreomycin, kanamycin) a jedno ATB z fluorochinolové řady<sup>19</sup>
- c) TDR-TB (totální resistance) - resistance na všechna AT I. i II. volby, první případ této resistance byl zdokumentován v roce 2005 v Itálii, následovány Iránem, Indií a Jižní Afrikou. WHO toto pojmenování neuznává, zjednodušeně se však jedná o resistanci na antituberkulotika I. i II. volby. Po zavedení bedachilinu do klinické praxe v roce 2012 se některé kmeny dříve totálně rezistentní staly citlivé na zmiňovanou látkou, označení TDR-TB se proto v posledních několika výročních zprávách WHO o TBC neobjevuje. Vzhledem k častým mutacím *M.tbc* nové LP nebudou poskytovat ochranu v delším časovém horizontu. Lepší klinické výsledky může přinést adjuvantní terapie jako vakcinace, vitamínová suplementace či biologická léčba. Jako doplněk klasické chemoterapie by mohla vést k většímu benefitu z léčby<sup>35</sup>.
- d) RR-TB- rifampicin rezistentní tuberkulóza – ať už jako mono-, polyresistence, případně jako součást MDR- TB či XDR- TB

Mechanismy resistance zahrnují:

- a) Kompenzační vývoj – mutace se většinou objevují, pokud léčivá látka (LL) nedosáhne v organismu minimální inhibiční koncentraci (MIC). Mutace většinou zpomaluje důležité biologické procesy v bakteriální buňce jako růst a virulence. Kompenzační (sekundární) mutace se pak snaží tyto biologicky nevýhodné změny navrátit bez ztráty rezistence vůči podanému antituberkulotiku<sup>36</sup>.
- b) Epistáze – tento jev znamená, že mutace spolu interagují, až dojde k vytvoření nového znaku. Tento znak se projeví jako vývojově výhodný (pozitivní) anebo vývojově nevýhodný (negativní) až letální pro samotnou bakterii<sup>37</sup>.
- c) Snížená permeabilita buněčné stěny – PE11 je považován enzymaticky za lipázu a esterázu, tento protein je odpovědný za udržení stability buněčné stěny a její remodelaci. Expres modulovaného proteinu u *M. smegmatis mc2155* vedla k úpravě stavby prokaryotní buňky, k agregaci, ke změně kompozice a k tvorbě pelikuly. Tento příklad vedl k objevu, že up-regulace tohoto proteinu vede ke sníženému průniku některých antituberkulotik (INH, RIF, EMB)<sup>38</sup>.



- d) Zvýšená exprese effluxních transportérů <sup>39</sup> - u MDR – resistantních kmenů byla zjištěna korelace mezi zvýšenou expresí effluxních transportérů a resistencí. U izolovaných kmenů byla podle citované studie minimálně jedna effluxní pumpa nadměrně exprimována. Zablokování těchto transportérů by mohlo být místem účinku nových léčiv.
- e) Modifikace cílového místa účinku – některé *M.tbc* mají ve svém genomu zakódován *erm37*, který ovlivňuje rRNA methyltransferázu. Nedojde následně k interakci makrolidu s ribozomem <sup>40</sup>.
- f) Modifikace léčiva – bakterie je schopná také produkovat EIS proteiny, které jsou považovány za homology AG acetyltransferázy, tyto intracelulární proteiny přežití jsou schopny chránit proti kapreomycinu, který je po interakci acetylován <sup>41</sup>.
- g) Cílové mimikry – týkají se mechanismu účinku (MÚ) fluorochinolonových ATB, MfpA (Mycobacteria FQ resistance protein A) je schopen měnit tvar, velikost a povrch DNA. Když dojde k navázání proteinu na DNA gyrázu, zablokuje se vazebné místo pro daný fluorochinolon a nedojde k vyvolání účinku ATB <sup>42</sup>.

Tyto mechanismy umožňují mykobakteriím upravit svou schopnost přežít, délku životního cyklu či případnou virulenci. Mutace pak dokážou stabilizovat daný fenotyp rezistence v rámci druhu. Pochopení a studium těchto mechanismů pak umožní vědcům a jiným odborným pracovníkům identifikovat nové cíle působení léčiv v oblasti vývoje nových léčiv a LP. Léčba resistantních kmenů je velkou zátěží pro nemocné pacienty, často navíc imunokompromitované (HIV – pozitivní). Složitá terapie často obsahuje toxická léčiva pro lidský organismus s častými nežádoucími účinky. Navíc dochází k šíření MDR-TB, která otevírá cestu jiným potenciálně resistantním bakteriím. Moderní výzkum proto klade velký důraz na znovuoživení látek, které budou mít minimální vedlejší účinky a které budou působit na latentní i aktivní formy patogenu. Pokud vyřešíme mechanismy rezistence a budeme dodržovat DOTS <sup>43</sup> (doporučení, jak správně postupovat během léčby TBC) je šance tento patogen porazit jednou provždy <sup>44</sup>.

Podle zprávy WHO v roce 2016 41 % z 3,4 milionů nově potvrzených nakažených jich bylo resistantních na rifampicin (nárůst z 31 % v roce 2015). V celosvětovém měřítku 153 119 případů (26 % z celkového počtu asi 600 000 případů) MDR – TB a rifampicin resistantních TB (MDR/RR-TB) bylo zaznamenáno v roce 2016. Mezi MDR/RR-TB bylo i 36 % resistantních na ATB fluorochinolonové řady (nárůst o 3 % oproti roku 2015). 8014 případů XDR- TB bylo zaznamenáno v 72 státech, z nichž 75 % leželo v Evropě nebo v jihovýchodní Asii. Nejvíce postižena byla Indie (2464 případů), Ukrajina (1195 případů) a Jižní Afrika (967 případů).

Na citlivost k antituberkulotikům byl v České republice testován materiál od 361 pacientů v roce 2016. Nejčastěji byla přítomna rezistence na streptomycin ve 22 případech (6,1 %), následně v 17 případech (4,7 %) na isoniazid, v 7 (1,9 %) na rifampicin a 5 pacientů (1,4 %) bylo resistantních na podání etambutolu. Multirezistence byla zjištěna v 6 případech (1,7 %) <sup>22</sup>.

Pro rychlé zjištění resistantních kmenů na rifampicin či zkříženou resistenci doporučuje WHO používat Xpert MTB/RIF. Jedná se o molekulárně genetickou metodu, která nám dokáže potvrdit/vyvrátit resistenci v řádu několika hodin. Úspěšnost léčby TBC se odhaduje asi na 83 %, klesá na 54 % u pacientů trpících MDR/RR-TB. U XDR/TB je pravděpodobnost úspěšné léčby ještě o něco nižší – asi 30 %<sup>4</sup>.

### 3.8 Léčebný režim TBC

Aby byla léčba úspěšná, je nutné antituberkulotika podávat po dobu 6-12 měsíců. Délka trvání léčby závisí na stavu nemocného, přidružených chorobách a použité kombinaci LP. Léčiva se musejí podávat dlouhodobě z důvodu heterogenity kmenů a primární resistenci bakterie<sup>18</sup>.

Na začátku terapie (iniciální fáze) se používá čtyřkombinace antituberkulotik (isoniazid + rifampicin + ethambutol + pyrazinamid), případně se přidává jako pátý LP aminoglykosid streptomycin. Antituberkulotika se podávají v jedné ranní dávce pod dohledem zdravotnického personálu (DOTS –directly observed treatment, short-course). Pacient je po tři měsíce hospitalizován na některém z infekčních oddělení nemocnice, aby nerozšiřoval nákazu. Léky užívá buď v denním anebo intermitentním režimu (3x týdně). Pro překonání iniciální fáze se používají zde zmíněna léčiva první volby<sup>10,18</sup>.

Přibližně po třech měsících je pacient propuštěn do ambulantní péče, kde se většinou pokračuje dvojkombinací antituberkulotik (isoniazid + rifampicin) po dobu 4 měsíců, u rizikových pacientů se používá trojkombinace (isoniazid + rifampicin + ethambutol). Léky jsou opět podávány v jedné denní dávce pod odborným dohledem. Tato situace nastává, pokud se jedná o resistantní kmen. Tato dlouhodobá léčba TBC je velmi vyčerpávající pro lidský organismus obzvlášť kvůli výskytu nežádoucích účinků. Nejzávažnějšími z nich jsou hepatotoxicita isoniazidu a rifampicinu. U aminoglykosidů je pak problémem vyvolaná oto-, nefrotoxicita. U etambutolu může dojít k vyvolání neuritidy zrakového nervu. Hyperurikémie se pak může vyskytnout při léčbě pyrazinamidem<sup>19,34</sup>.

Velkým problémem je při léčbě opět resistance mykobakterií. Na léčbu multiresistence se používá čtyřkombinace zvolená podle mikrobiologické citlivosti. Podle citlivosti se nejčastěji vybírá ethionamid, aminoglykosidy a jejich analogy jako kapreomycin, fluorochinolony III. generace. Kyselina *p*-aminosalicylová (PAS) se pak používá pouze ve výjimečných případech hlavně v zemích třetího světa<sup>18</sup>.

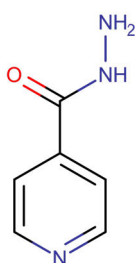
Zkrácený MDR-TB léčebný režim byl vytvořen podle WHO a rozdělen na dvě části. V první fázi jsou pacientovi po dobu 4 měsíců podávána tato léčiva: fluorochinolon 3. generace (moxifloxacin, gatifloxacin), kanamycin, prothionamid, klofazimin, vysoké dávky isoniazidu, pyrazinamid a etambutol. V druhé fázi režimu dostává pacient po dobu 5 měsíců tato léčiva: moxifloxacin nebo gatifloxacin, klofazimin, pyrazinamid a etambutol<sup>45</sup>.

Ještě 6 měsíců po ukončení léčby jsou pacienti zavedeni ve skupině aktivní TBC. Osoby, které s nimi přicházely prokazatelně do kontaktu, jsou bráni jako tzv. kontakty a také

vyšetřování na přítomnost patogenu. Pacientům ve skupině aktivní TBC jsou pravidelně odebírány vzorky sputa a jiného biologického materiálu. Následně jsou přerazeni do skupiny inaktivní TBC po dobu tří let. Zde se opět testuje jejich sputum a probíhají pravidelné klinické a rentgenové (RTG) kontroly. Pokud se však vyskytnou rizikové faktory, jsou převedeni do rizikové skupiny, kde jsou pravidelně jedenkrát ročně podrobeni pravidelnému vyšetření<sup>34, 46</sup>.

### 3.8.1 Léčiva I. linie

#### *Isoniazid*



Isoniazid jako derivát kyseliny isonikotinové je považován za mykobaktericidní léčivo. Spektrum účinku je poměrně široké, protože působí kromě *Mycobacterium tuberculosis* i na *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium kansasii*. Jedná se o velmi důležité léčivo první linie antituberkulotik, používané od roku 1952. Mechanismem účinku je blokáda syntézy mykolových kyselin<sup>18</sup>.

Isoniazid je proléčivem a musí být aktivován enzymem katalázou – peroxidasou KatG. Vzniká velmi reaktivní produkt, jenž tvoří komplex s NAD<sup>+</sup>, který je silným inhibítozem NADH – dependentní enoyl – ACP reduktázy, která prodlužuje řetězec mykolových kyselin. Dochází i k produkci kyslíkových radikálů (superoxidový, peroxidodíkový, peroxinitritový), které obdobným mechanismem narušují syntézu mykolových kyselin jako základního kamenu bakteriální stěny. Isoniazid interferuje i s metabolismem pyridoxinu, způsobuje zvýšenou exkreci a inhibuje enzym pyridoxinfosfokinasu<sup>18,47</sup>.

Nejčastější příčinou mutace je změna na úrovni enzymu KatG. Proléčivo poté není konvertováno na aktivní formu a INH má tedy sníženou aktivitu<sup>47</sup>.

Běžně se podává dávka 5 mg/kg hmotnosti najednou, při intermitentním léčebném režimu se upravuje na 15 mg/kg 3krát týdně, maximální dávka je 900 mg při intermitentním podání (jednotlivá dávka: max. 300 mg)<sup>19</sup>.

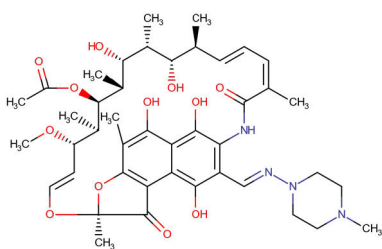
Isoniazid je metabolizován v játrech *N*-acetyltransferásou, kde acetylací vzniká acetylisoniazid a kyselina isonikotinová. Při metabolismu INH hraje důležitou roli fenotyp každého jedince. Poločas eliminace se udává 1 h u rychlých acetylátorů a až 5 hodin u pomalých. Udává se, že většina léčiva (70-96 %) je vylučována močí<sup>47,48</sup>.

Isoniazid je kontraindikován u epileptiků, protože může způsobovat neurotoxicitu CNS i PNS. Občas se objevují závratě, pocity opilosti, bolesti hlavy, zapomětlivost, nespavost a velmi ojediněle se mohou objevit deprese či psychotické příhody. Máme zaznamenány i případy, že pacienti po užití INH měli tendenci spáchat sebevraždu<sup>49</sup>. Samotná neurotoxicita se projevuje paresteziemi, pálením chodidel, případně ztuhlostí a záškuby svalstva. Tyto

nežádoucí účinky lze snížit suplementací pyridoxinem (vitamín B6), doporučuje se užívat až 200 mg vitamínu B6 denně. Důležité je zmínit i hepatotoxicitu, která pouze od laboratorních změn může vést k akutní hepatodystrofii zvláště u jedinců se sníženou funkcí jater, alkoholiků či u žen v přechodu. Ve výjimečných případech se může objevit i horečnatý stav s výsevem exantému<sup>19,47</sup>.

Léčivo by se mělo užívat na prázdný žaludek, protože INH se absorbuje nejlépe při velmi kyselém pH, uhlohydráty dokážou snížit vstřebávání celkově až o 50 %, proto by se společně s isoniazidem neměly konzumovat potraviny a nápoje s vysokým obsahem cukru. Jelikož INH inhibuje enzym monoaminoxidázu (MAO), může po požití společně s potravinami bohatými na tyramin a histamin nastat tyraminová reakce. Jedná se o akutní stav zahrnující palpitaci, flush, pocení, průjem, otok a svědění. Pacient by se měl vyhnout především těmto potravinám: švýcarské sýry a čokoláda, ryby a z alkoholických nápojů především červené víno<sup>50</sup>.

## Rifampicin



Rifampicin je v dnešní době považován za nejúčinnější léčivo TBC, používán je od roku 1966. Jedná se o širokospektré baktericidní léčivo, citlivé jak na G+ i na G – bakterii, proto se s oblibou používá u terapeutických režimů při závažných stafylokokových infekcích<sup>17</sup>. Rifampicin je semisyntetické antibiotikum ze skupiny rifamycinů izolováno jako produkt z plísně *Amycolatopsis rifamycinica*<sup>51</sup>.

Rifampicin (RIF) inhibuje transkripci mykobakterií zablokováním DNA – dependentní RNA polymerázy. Bakterie není schopna nově nasyntetizovat proteiny a mRNA, proto následně umírá<sup>18,19,47</sup>.

Resistence se objevuje díky mutaci v genu *rpoB*, který kóduje beta řetězec zmiňované RNA polymerázy<sup>47</sup>.

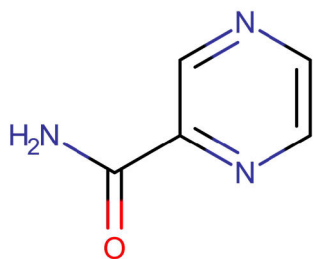
Obvykle se bere 600 mg ráno nalačno, u pacientů s hmotností nižší než 50 kg se pak dávka snižuje na 450 mg. U pacientů s pomalou debacilací, kde příčinou je nízká sérová koncentrace rifampicinu, je možné dávku upravit až na ranní dávku 900 mg nalačno. Při intermitentním podávání se preferuje dávka 600 mg dvakrát až třikrát týdně (15 mg/kg). Při perorálním podání je maximální sérová koncentrace dosažena do dvou hodin od administrace, proniká dobře do všech tělních tekutin a jeho distribuční objem činí 0,6- 1,0 litru/ kg. Z velké části (až 80 %) je navázán na proteiny<sup>19</sup>. 85 % léčiva je metabolizováno mikrosomálním systémem CYP450. Většina léčiva je exkretována žlučí (až 65 %) a malá část (6–5 %) prodělavá enterohepatický oběh. Po indukci mikrosomálního CYP450 za 14 dnů se poločas eliminace RIF zkracuje z 3–5 hodin na 2–3 hodiny<sup>47</sup>.

Rifampicin je ve většině případů tolerován dobře. Jelikož je ale transportován jako bilirubin, může velmi ojediněle vyvolat ikterus a cholestázu. Zaznamenáváme i trávicí obtíže jako nevolnost, vomitus, křeče či průjem. Léčivo může indukovat symptomy chřipky

(flu-like syndrom) patrné zvláště při intermitentním podávání. Rifampicin ovlivňuje i imunologickou odpověď organismu: leukopenie, trombocytopenie, hemolytická anémie, agranulocytóza. Barví do oranžova tělní tekutiny i kontaktní čočky, kdy zbarvení moči je často mylně diagnostikováno jako hematurie <sup>18,19,47</sup>.

Potrava snižuje absorpci a zpomaluje vstřebávání podobně jako antacida. Nejvíce interakcí je však na úrovni CYP450 a P-glykoproteinu, indukci dochází ke snížení účinků perorální kontracepce, statinů, digoxinu, blokátoru vápníkových kanálů (CaB), antidepresiv, antiepileptik <sup>18,47</sup>. Ketokonazol a kyselina *p*-aminosalicylová musí být dokonce podány s 12 hodinovým rozestupem kvůli markantnímu snížení biodostupnosti RIF <sup>52</sup>.

## Pyrazinamid



Je syntetickým pyrazinovým analogem nikotinamidu. Má baktericidní účinek pouze v kyselém prostředí na fagocytující mykobakterie uvnitř buněk, proto je vhodným léčivem při iniciální fázi. Působí pouze na *M. tuberculosis*, ne na bovinní mykobakterie <sup>18,19</sup>. Tato sterilizační aktivita umožní zkrácení léčby na 4-6 měsíců při použití rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu (RHZ režim) <sup>47</sup>.

Dobře se vstřebává po podání per os, maximální koncentraci je schopen dosáhnout za 2 hodiny po administraci. Minimální baktericidní koncentrace je 12,5 µg/ml, proto je dávkován v tabletách po 500 mg, abychom dosáhli koncentrace minimálně 30 µg/ml. Maximální dávka je stanovena na 3500 mg, poté můžeme očekávat zvýšené riziko hepatotoxicity <sup>19</sup>.

Mechanismus účinku není stále zcela objasněn:

- a) Enzymatická přeměna pyrazinamidu na pyrazin-2-karboxylovou kyselinu (POA) pomocí pyrazinamidázy

PZA vstupuje do mykobakterií pasivní difúzí a je přeměněn na POA (pKa 2,9) pomocí kódované cytoplazmatické pyrazinamidázy genem *pncA*. POA pak opouští buňku pasivní difúzí. Jakmile je POA mimo buňku, získáme kyselé pH extracelulární tekutiny, malý podíl POA se přemění na HPOA (nenabitá protonovaná forma), která snadno přechází opět přes membránu a uvolňuje proton. HPOA přináší protony, které okyselují cytoplasmu. Dochází k inhibici důležitých enzymatických procesů. POA navíc dokáže rozvrátit energetickou rovnováhu, stabilitu membrány či transport. Navíc, POA zastavuje syntézu proteinů a RNA úpravou intracelulárního pH. Využívá se v iniciální fázi terapie TBC kvůli kyselému pH zánětu <sup>53</sup>.

- b) Inhibice *trans*-translace

POA také narušuje ribozomový záchranný proces *trans*-translace v mykobakteriích. POA se váže v karboxyterminální doméně ribosomálního proteinu S1 (RpsA) a inhibuje *trans*-translaci, což vede k akumulaci defektních proteinů. *Trans*-translace je proces využívaný bakteriemi k uvolnění ribosomů, které se zastavily na transkriptech mRNA kvůli chybějícímu stop-kodonu. Speciální tmRNA se společně s RpsA proteinem váže na mRNA a tím zamezí této *trans*-translaci <sup>54</sup>.

c) Inhibice syntézy mykobakteriálního koenzymu A a interakce s aspartát dekarboxylázou

Podle nejnovějších studií je prokázáno, že POA (ne jeho prekurzor PZA) se navazuje na C-konec enzymu aspartát dekarboxyláza, jež je kódován *panD* genem. Jedná se o důležitý enzym především pro konverzi *L*-aspartátu na  $\beta$ -alanin, který je jednou ze složek panthotenátu a především pak koenzymu A. Koenzym A zasahuje do metabolismu mastných kyselin a ovlivňuje metabolismus mastných kyselin – procesy pro buňku esenciální <sup>55</sup>.

d) Inhibice Fatty acid synthase I (FAS I)

Úkolem enzymu je syntetizovat prekurzory mykolových kyselin a krátké  $\alpha$  – řetězce, FAS II pak tyto řetězce nutné pro výstavbu bakteriální stěny prodlužuje. Inhibováním enzymu FAS I zablokujeme sestavování mykolových kyselin, buňka není schopna koexistovat. Podle některých prací PZA a  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (redukční činidlo při syntéze mykolových kyselin) kompetují o vazebné místo na FAS I. Tato kompetice nastává však až při vyšších koncentracích PZA v organismu <sup>56</sup>.

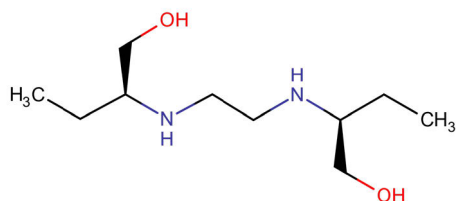
e) Interference syntézy  $\text{NAD}^+$

Fosforibosyltransferáza kyseliny chinolinové (QAPRTáza, EC 2.4.2.19) je klíčovým enzymem *de novo* biosyntézy nikotinamid adenin dinukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ) potencionálním cílem pro vývoj nových léků proti tuberkulóze. QAPRTáza katalyzuje syntézu mononukleotidu kyseliny nikotinové z kyseliny chinolinové (QA) a 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu (PRPP) reakcí fosforibosylového přenosu s následnou dekarboxylací. PZA, který je považován za strukturálním analogem kyseliny chinolinové, značně inhiboval katalytickou aktivitu MtQAPRTázy. Struktura PZA proto může poskytnout základ pro návrh nových inhibitorů MtQAPRTázy <sup>57</sup>.

Pyrazinamid je lékem volby u krátkodobých režimů, je kontraindikován u pacientů s poruchou jater. Při podané dávce je důležité dlouhodobě nepřekračovat 50 mg/kg při intermitentním podávání. Jedná se nejvíce hepatotoxické léčivo zmíněné v této diplomové práci. Pyrazinamid snižuje tubulární sekreci kyseliny močové, a proto vyvolává hyperurikémii až klinickou manifestaci dny. Allopurinol blokuje xanthinoxidázu a tedy i metabolismus pyrazinamidu, což může přispět paradoxně k zhoršení hyperurikémie. Léčivo může způsobit fotosensitivní dermatitidu, vyrážku, svědění a gastrointestinální (GIT) symptomy.

Rhabdomyolýza a myoglobinurie je závažnou komplikací, která může být důvodem přerušení léčby pyrazinamidem <sup>18,19,47</sup>.

### *Ethambutol*



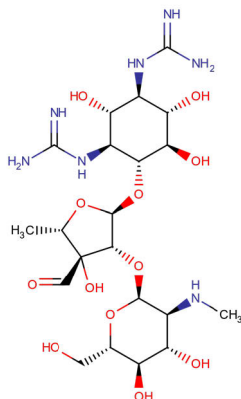
Ethambutol (EMB) je synteticky připravené bakteriostatické AT I. volby známé od roku 1966, působí na *M. tuberculosis*, ale i na netuberkuloidní mykobakterie. Jedná se o (S,S)-Ethambutol, jiná optická konfigurace je toxická vzhledem k optickému nervu. Ethambutol blokuje enzym arabinosyltransferázu kódovanou genem *embB*, který je odpovědný za polymeraci arabinosy na arabinogalaktan, čímž dochází k narušení biosyntézy cukerné složky bakteriální stěny. Resistence vzniká pomalu pravděpodobně kvůli mutaci v genu *embB* <sup>18,47,58</sup>.

Dobře se vstřebává po perorálním podání, maximální koncentrace je dosaženo tři hodiny po podání. Denně se podává 25 mg/kg první dva měsíce, poté se dávka snižuje na 20 mg/kg. U intermitentního podávání se preferuje třikrát týdně v dávce 30 mg/kg <sup>19</sup>. Ethambutol je metabolizován převážně játry, léčivo je oxidováno na aldehyd a následně na dikarboxylovou kyselinu. Převážně je ethambutol vylučován močí (50–80 %), malá část pak žlučí (asi 20 %) <sup>47</sup>.

Velmi závažným nežádoucím účinkem je retrobulbární neuritida společně s poruchami barvocitu a vizu, proto před nasazením terapie EMB je nutná návštěva očního lékaře, který provede vyšetření perimetrem a barvocitu. Mezi další nežádoucí účinky zařazujeme GIT symptomy (nauzea, zvracení, bolesti břicha). Mohou se objevit i neurologické poruchy jako nevolnost, zmatenost, nespecifické bolesti hlavy. Jelikož EMB snižuje exkreci kyseliny močové, vede často k hyperurikémii a eventuální exacerbaci dnové artritidy. Velmi ojediněle se vyskytly i krevní dyskrázie (leukopenie, trombocytopenie) <sup>18,19,47</sup>.

### 3.8.2 Léčiva II. linie

#### *Streptomycin a další aminoglykosidy*



Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum produkované aktinomycetou *Streptomyces griseus*. Je až nepředstavitelné, kolik lidských životů zachránil Selman Waksman, když po téměř dvacetiletém bádání ve své laboratoři představil světu v roce 1944 streptomycin. Za tento ohromný objev obdržel v roce 1952 Nobelovou cenu, patent následně prodal firmě Merck <sup>59</sup>.

Správné terapeutické hladiny aminoglykosidů lze navodit pouze parenterálním podáním, tento aminoglykosid totiž působí baktericidně na extracelulárně uložená mykobakterie v alkalickém prostředí za přítomnosti kyslíku. Obvykle se nasazuje dávka 1 g intramuskulárně (i.m.) při denním i intermitentním režimu. Pokud se jedná o nemocného pacienta staršího 50 let nebo o pacienta s váhou menší než 50 kg, dávky redukuje na 0,75 g i.m. <sup>19</sup>.

Mechanismem účinku streptomycinu je navázání se na 30S podjednotku bakteriálního ribozomu, následně dochází k zastavení syntézy bakteriálních bílkovin. V kyselém prostředí (v místě zánětu a abscesů) streptomycin v menší míře proniká do bakteriální buňky, což může vést při monoterapii k jejímu selhání. Streptomycin neproniká ani dovnitř savčích buněk, nemá tudíž vliv na intracelulární mykobakterie. Aminoglykosidy mají dobrý efekt na rychle se dělící mykobakterie, naopak téměř nepůsobí na spící formy <sup>60,61</sup>.

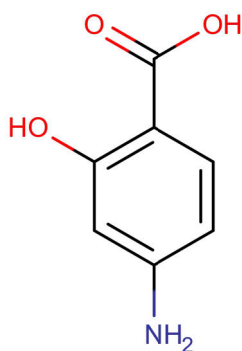
Streptomycin, podobně jako ostatní glykosidy, je ototoxický i nefrotoxický. Ototoxicita je manifestována závratěmi až hluchotou. Při podávání je nutno pravidelně a pečlivě kontrolovat renální funkce. U pacientů s poruchou ledvin je nutno redukovat dávku a změnit intervaly mezi dávkami. Amikacin se s výhodou používá u těchto pacientů kvůli nižší nefrotoxicitě a ototoxicitě <sup>62</sup>. Streptomycin je prokázaný teratogen, nesmí být podáván těhotným ženám. Po aplikaci se výjimečně objevují i kožní alergické reakce <sup>19,61</sup>.

Resistence na streptomycin se objevuje v oblastech s častým použitím tohoto léčiva i na jiná bakteriální onemocnění. Každý zástupce ze skupiny aminoglykosidů se váže na jiné vazebné místo, proto i rezistence na antibiotika (ATB) z této skupiny bude často velmi rozdílná. V oblastech s resistantními kmeny na streptomycin se s výhodou používá amikacin nebo polypeptid kapreomycin <sup>61,63</sup>.

Mezi jednotlivými léčivy ze skupiny aminoglykosidů (streptomycin, kanamycin a amikacin) a polypeptidem kapreomycinem je zaznamenána zkřížená rezistence, avšak nejlevnější volbou je kanamycin <sup>19</sup>.



## Kyselina *para*-aminosalicylová (PAS)



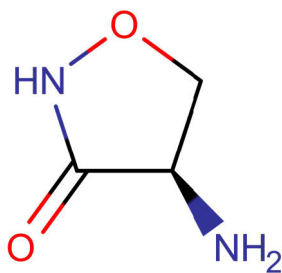
Tato kyselina (i v podobě soli kyseliny) je v klinickém používání od roku 1946. Toto mykobakteriostatické léčivo působící především extracelulárně se po mnoho let až do 70. let 20. století používalo v režimu s rifampicinem a streptomycinem. Léčebný režim s PAS byl postupně nahrazen ethambutolem, protože zde byla zaznamenána nižší incidence nežádoucích účinků spojených s GITem <sup>64,65</sup>.

Mechanismus účinku není do dnešních dní stále zcela objasněn. Kyselina *para*-aminosalicylová zasahuje do syntézy listové kyseliny bakteriální buňky, a navíc inhibuje zpětné vychytávání železa pro bakteriální metabolismus, jelikož blokuje siderofor mykobaktin <sup>65,66</sup>.

U pacientů s indikovanou PAS se můžou objevit nežádoucí účinky, mezi které patří hepatitida, GIT symptomy, hypotyreóza (po přerušení se hladina hormonů štítné žlázy sama upravuje), encefalopatie, perikarditida a optická neuritida. Zvláště opatrní bychom měli být u pacientů se známou alergií na aspirin (strukturní podobnost) a s deficitem enzymu glukóza-6-dehydrogenázy <sup>66</sup>.

PAS je jedním z posledních léků pro léčbu značně nebezpečné XDR-TB. V kombinaci se streptomycinem byla zdokumentovaná vysoká úspěšnost léčby – až 5leté přežití pacientů. V kombinaci s ostatními účinnými LP však zaznamenáváme vysokou úmrtnost (až 90 %). Optimální dávka v kombinaci se streptomycinem je 20 g. Pokud však do kombinace zakomponujeme isoniazid, můžeme dávku léčiva snížit i na čtvrtinu. V současných režimech léčby XDR-TB tak dávku 8-12 g hodnotíme jako nedostatečnou. Ve většině zemí se většinou pro formulaci PAS využívá léková forma (LF) s prodlouženým uvolňováním, proto se zvažuje změnit dávkovací režim na jednu dávku denně. Podle nejnovějších studií jsme schopni dosáhnout poměrně dobře vysokých koncentrací v plazmě a také interval, kdy hladina léčiva klesne pod MIC, se s touto formulací prodloužil. To vše přispívá k lepšímu monitorování lékových hladin a snižuje riziko nežádoucích účinků <sup>67</sup>.

## D-cykloserin



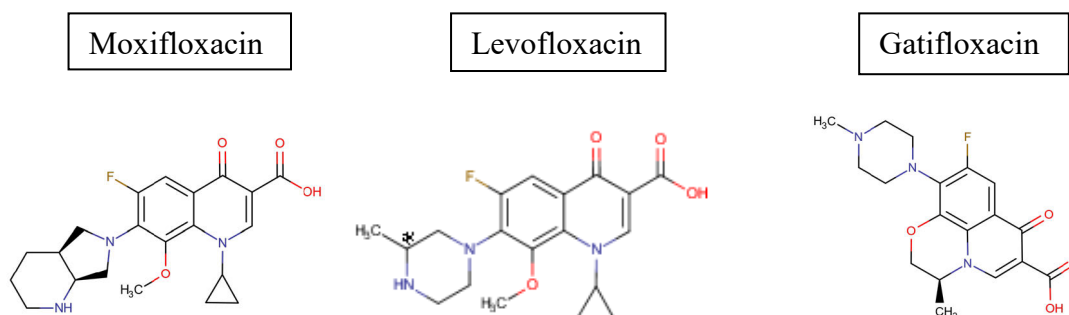
Cykloserin vykazuje bakteriostatický efekt na mykobakterie blokováním dvou kroků při syntéze mykobakteriální stěny. Je strukturním analogem aminokyseliny (AMK) D-alaninu. Spojením dvou molekul získáme terizidon. Cykloserin/terizidon inhibuje enzymy D-alanyl-D-alanin syntetázu, alanin racemázu a alanin permeázu odpovědné za syntézu peptidoglykanu mykobakteriální stěny <sup>66</sup>.

Cykloserin má podle studií z 50. let nižší účinnost ve srovnání s PAS a bylo zde zaznamenáno mnoho nežádoucích neurotoxických účinků <sup>68</sup>. U

50 % pacientů s dávkou vyšší jak 1 gram denně se objevily konvulzivní záchvaty, psychotické poruchy, mutismus, ospalost a kóma<sup>66</sup>.

Potrava významně snižuje absorpci až o 35 %, pacient by se měl vyhnout pomerančům, které snižují absorpci signifikantně o 15 %. Kombinace s ethionamidem a s isoniazidem může potenciovat neurotoxický efekt. Aby se těmto problémům předešlo, zajistí se suplementace vitamínem B6. Při souběžném užívání fluorochinolonů musí být pacienti pod dohledem neurologa kvůli vlivu na CNS a PNS. Alkohol potencuje riziko křečí<sup>66</sup>.

## Fluorochinolony



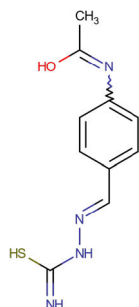
Fluorochinolony se k terapii TBC používají od roku 1985. S výhodou se užívají především zástupci III. a IV. generace – moxifloxacin, levofloxacin ((S)-Ofloxacin) a gatifloxacin. Fluorochinolony jako baktericidní ATB pronikají dobře do všech tělních sekretů a také dovnitř buněk, proto jsou schopné interferovat intracelulárně působící mykobakterie. Největší baktericidní aktivitu vykazují moxifloxacin a gatifloxacin<sup>66</sup>. Nevyskytuje se u těchto ATB zkřížená resistance. Je zajímavé, že kmeny resistantní na ofloxacin jsou citlivé na levofloxacin a moxifloxacin<sup>69</sup>.

Mechanismem účinku je inhibice DNA gyrázy (topoizomerázy II), která je zodpovědná za správné rozřetení DNA při replikaci. *In vitro* vykazují tyto ATB i inhibici topoizomerázy IV, tento enzym však není přítomen v mykobakteriální buňce<sup>66, 70</sup>. Po perorálním podání jsou tyto látky rychle absorbovány a maximální sérové koncentrace dosahují do 3 h. Fluorochinolony jsou odbourávány ledvinami pomocí glomerulární filtrace a tubulární sekrece. Poločas eliminace těchto léčiv se nachází v rozmezí 4–13 hodin<sup>66</sup>.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky lze zařadit GIT symptomy (nauzea, zvracení, průjem, pseudomembranózní kolitida). Občas se můžou objevit alergické kožní reakce a krevní synkrazie jako eozinofilie a trombocytopenie. U sportovců můžou vyvolat při zvýšené námaze i ruptury šlach, u starších lidí se použití fluorochinolonů nedoporučuje kvůli prodloužení QT intervalu. Kontraindikací pro léčbu je bezpochyby epilepsie či jiné onemocnění CNS v anamnéze, nesmí tato léčiva též užívat těhotné a kojící.

Biologickou dostupnost těchto ATB snižují antacida, LP a doplňky stravy s obsahem hliníku, hořčíku, železa a vápníku. Mezi těmito přípravky bychom měli dodržovat rozestup alespoň 2 hodiny. Jejich účinek antagonizují nitrofurantoinová ATB<sup>70</sup>.

## Thiacetazon (THA)

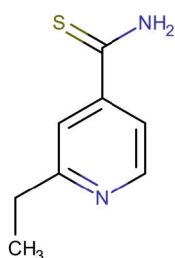


Thiacetazon je jednou z nejstarších, nejlevnějších a v minulosti velice rozšířených léčiv pro léčbu TBC zvláště v chudých oblastech Afriky. I přesto, že jeho bakteriostatický účinek je velice slabý. Obvykle se kombinuje s isoniazidem. Pro imunokompromitované pacienty (HIV – pozitivní) může mít použití tohoto léčiva drastické následky jako je například Stevens – Johnson syndrom<sup>19,71</sup>.

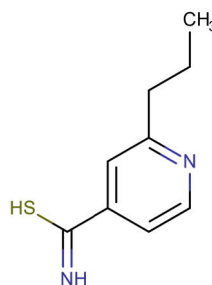
Mechanismus účinku zůstává do dnešních dní záhadným tajemstvím. Thiacetazon je proléčivo aktivované mykobakteriální monoaminoxidázou EthA<sup>72</sup>. Předpokládá se, že inhibuje cyklopropanaci mykolových kyselin. Tato hypotéza vyplývá ze skutečnosti, že dochází k akumulaci nenasycených prekurzorů kyseliny mykolové. Thioaceton pravděpodobně neinhibuje FAS-II (syntáza mastných kyselin), ale působí v dalších krocích. Meromykoláty (dlouhé kyseliny o větším počtu uhlíků) nejsou tedy v přítomnosti THA cyklopropanovány<sup>71,72</sup>.

## Ethionamid, prothionamid

Ethionamid



Prothionamid

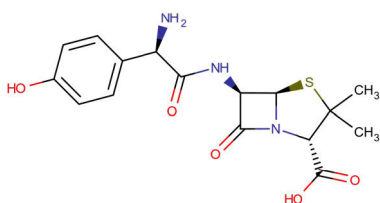


Oba dva zástupci patří do skupiny thioamidů a mají podobné vlastnosti. Ethionamid je znám v klinické praxi od roku 1956, je proléčivem a analogem isoniazidu (není zaznamenána zkřížená rezistence). Aktivován je bakteriální monoaminoxidázou EthA. Ethionamid inhibuje syntézu mykolové kyseliny, působí mykobakteriostaticky<sup>17</sup>. Obě dvě látky jsou po perorálním podání kompletně vstřebány a do 1 h dosáhnou maximální sérové koncentrace. 30 % ethionamidu je navázané na plazmatické bílkoviny, látky jsou metabolizovány v játrech a vylučovány především močí<sup>66,73</sup>.

Při podávání se často objevují zažívací potíže či kovová chuť v ústech. Ethionamid je velmi neurotoxický, způsobuje deprese, halucinace, křeče a občas i optické a periferní neuritidy, riziko se zvyšuje při souběžném podávání s isoniazidem anebo terizidonem. Tyto problémy můžeme minimalizovat pravidelným podáváním pyridoxinu (100 mg/ denně) Kvůli strukturní

podobnosti s isoniazidem se asi u 4 % pacientů může vyskytnout hepatotoxicita – nedoporučuje se proto indikovat lidem, kde hrozí abúzus alkoholu. Posturální hypotenze byla zaznamenána při léčbě ethionamidem. Velmi zřídka se poté vyskytly i kožní reakce jako exantém, akné a fotosensitivita. Zvýšené riziko hypothyreózy maximalizuje souběžná terapeutická léčba PAS <sup>66</sup>.

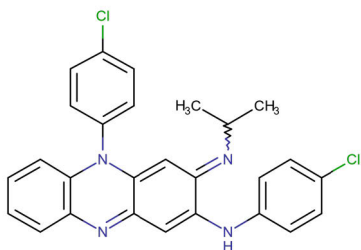
## Amoxicilin



Amoxicilin s kyselinou klavulánovou, která inhibuje  $\beta$ -laktamázu mykobakterií, se využívá jako sporadická doplňková terapie při TBC. S výhodou se používá u HIV – pozitivních pacientů, interakce s antivirotyky je totiž nepravděpodobná <sup>74</sup>.

Amoxicilin patří do skupiny acidostabilních penicilinů s širokým spektrem účinku nestabilní vůči účinku  $\beta$ -laktamáz. Betalaktámy inhibují penicilin vázající proteiny (PBP) = transpeptidázu, která příčně spojuje sousední peptidoglykanové řetězce. Nežádoucí účinky jsou obvykle pouze mírné jako nauzea a průjem. U citlivých jedinců může ATB vyvolat dokonce anafylaktický šok či pseudomembranózní kolitidu <sup>75</sup>.

## Klofazimin

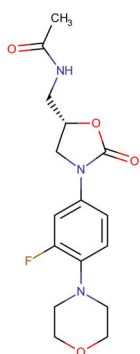


Klofazimin byl původně objeven jako léčivo TBC, později byl však využíván k léčbě lepry. Klofazimin je bakteriostatické (velmi slabě cidní) léčivo působící na rychle i pomalu rostoucí mykobakterie. Má velmi široké spektrum účinku-působí na G<sup>+</sup> bakterie, parazity i houby. Je schopen léčit malárii, leishmanózy a dokonce i mykózy způsobené *Candida albicans* <sup>76</sup>.

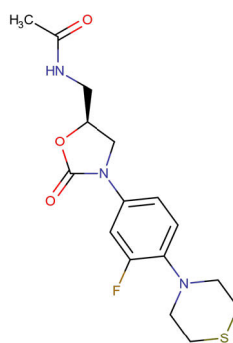
Na frakci *M. smegmatis* byl zjištěn pravděpodobný mechanismus účinku. Klofazimin kompetuje o elektrony s menaquinonem, který je substrátem enzymu NADH-chinon oxidoreduktázy. Tento enzym vstupuje do iniciační fáze dýchacího řetězce bakteriální buňky. Takto redukovaný klofazimin indukuje proces tvorby antimikrobních reaktivních forem kyslíku (ROS) jako superoxid anebo peroxid. Klofazimin jako amfifilní látka je schopen inhibovat ATPázy v buňce, což vede ke konformačním změnám v bakteriální buňce se ztrátou esenciálních funkcí <sup>76</sup>.

Klofazimin může vyvolat přechodné zbarvení kůže a sliznic, GIT problémy (nauzea a zvracení) a depresivní stavy. Není vhodným léčivem u starších lidí, protože prodlužuje QT interval <sup>76</sup>.

## Linezolid, sutezolid



Linezolid



Sutezolid

Linezolid je oxazilindiové ATB využívané s velkou výhodou u léčebných režimů MDR-TB. U randomizované klinické studie týkající se XDR-TB <sup>77</sup> v Čínské lidové republice zaznamenal linezolid významný léčebný úspěch při kombinovaném terapeutickém režimu. Byly zaznamenány však poměrně vážné nežádoucí účinky, kterými jsou myelosuprese (anémie) a neuropatie (periferní a optická). Linezolid může vyvolat i laktátovou acidózu. Těmto život ohrožujícím komplikacím můžeme předejít snížením dávky z 1200 mg na polovinu bez signifikantní ztráty účinku léčiva <sup>74,78</sup>.

Linezolid se vstřebává ze 100 % a dobře prostupuje do všech tkání včetně mozkomíšního moku. Částečně se váže na plazmatické bílkoviny (31%). Metabolizován je oxidací na dva inaktivní metabolity a poté vyloučen převážně močí. Jedná se o inhibitor monoaminooxidás A i B, a proto je kontraindikováno společné podání s tricyklickými antidepresivy (TCA) a antidepresivy inhibující zpětné vychytávání serotoninu (SSRI) <sup>74,78</sup>.

Sutezolid se dá považovat za analog linezolidu. Je stále v klinickém výzkumu, kde se nachází ve fázi I. Podle předběžných výsledků vykazuje menší četnost nežádoucích účinků a větší léčebný potenciál <sup>79</sup>.

### 3.8.3 Nová léčiva a budoucnost terapie TBC

Nová léčiva jsou objevována nejčastěji pěti různými přístupy <sup>80</sup>

- Nahodilý screening
- Objevování ztraceného
- Obměňování struktur stávajících léčiv
- Kombinatorní chemie
- Využití poznatků příbuzných oborů

Nasyntetizování *de novo* bedachilinu (TMC207) byl pro vědce ohromný úspěch. Patří mezi diarylchinoliny. Povedl se objevit nový mechanismus účinku, a to inhibice bakteriální ATP – syntázy. Bedachilin se váže na rezidua AMK umístěné na F1/F0 jednotce ATP-syntázy. V roce 2012 bylo schváleno toto léčivo pro léčbu MDR – TB úřadem FDA po téměř 40 letech od posledního antituberkulotika. Předpokládá se, že jako amfifilní látka zasahuje bedachilin i do iontového transportu na buněčné stěně. V kombinaci s klasickou terapií TBC vykazuje mnohem vyšší a rychlejší mykobaktericidní aktivitu (synergický účinek s ostatními antituberkulotiky). Bedachilin jako velmi lipofilní léčivo vykazuje značnou hepatotoxicitu. Kvůli inhibici srdečního hERG K<sup>+</sup> kanálu zvyšuje riziko ventrikulární repolarizace (prodloužení QT intervalu). V současné době se testují analogy bedachilinu s nižším log P, které mají nižší účinek na hERG kanál, ale srovnatelný účinek na *M.tbc*. V ČR je registrován LP s názvem Sirturo®, který obsahuje bedachilin fumarát<sup>76,81,82</sup>.

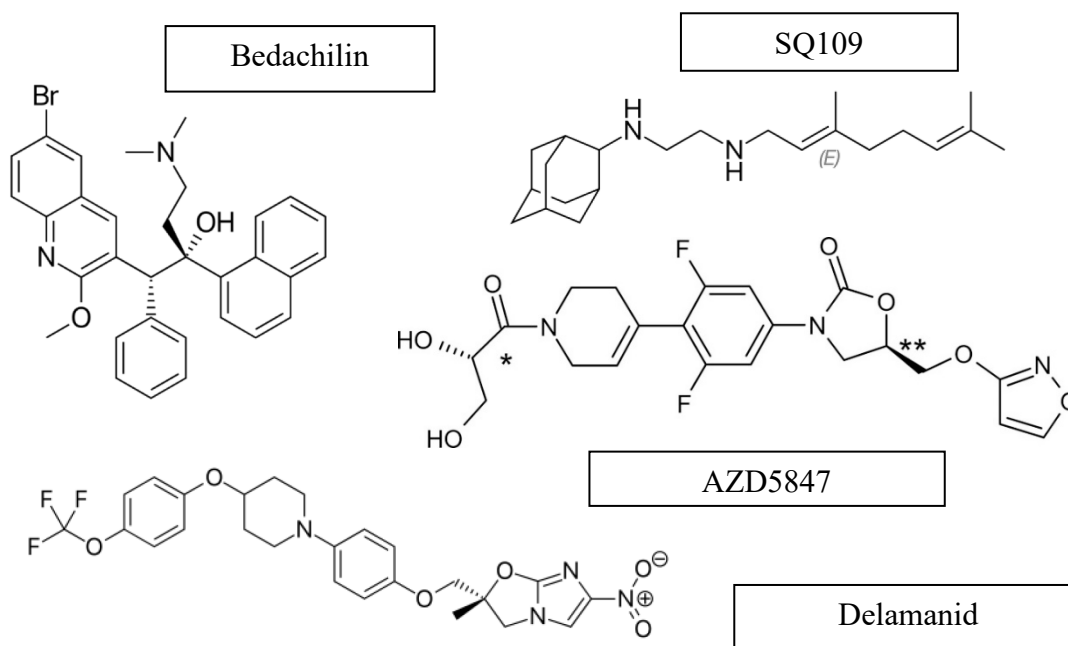
Dalším zástupcem je následně i ethylendiamin SQ109, který inhibuje zakomponování mykolových kyselin do buněčné stěny. Je zde zaznamenáno synergické působení s již zmíněným bedachilinem. SQ109 oslabí funkci buněčné stěny a bedachilin pak lehce inhibuje tvorbu ATP. Navíc, bylo zaznamenáno také společné synergické působení s isoniazidem a rifampicinem. Látka prochází klinickým hodnocením a počítá se s ní při léčbě MDR-TB z důvodu nízké schopnosti mutace<sup>35</sup>.

Do nové skupiny chemoterapeutik (derivátů oxazolidinonu) patří kromě linezolidu a sutezolidu i AZD5847. Mechanismem účinku je inhibice syntézy proteinu navázáním se na specifické části ribozomů. Bylo prokázáno, že AZD5847 má vynikající účinnost a lepší bezpečnostní profil vzhledem k ostatním derivátům oxazolidinonu<sup>35,83</sup>.

Dalším kandidátem je Q203, který působí na QcrB podjednotku *M.tb* cytochromu bc1 komplexu a tímto způsobem zastavuje syntézu ATP mykobakterie. Působí efektivně i na intracelulární mykobakterie. Zatím nebyly zjištěny interakce na úrovni CYP450 ani P-glykoproteinu, látka není ani kardiotoxická<sup>35</sup>.

Z nitroimidazooxazolových chemoterapeutik zde můžeme zařadit delamanid a pretomanid (PA-824). Obě látky se používají od 50. let k léčbě jak aerobních, tak anaerobních infekcí. Léčiva jsou schopna vytvořit oxid dusnatý (NO), který znemožní funkci cytochrom c oxidázy. Za přítomnosti kyslíku pak delamanid a pretomanid blokuje syntézu mykolových kyselin jako esenciální součásti bakteriální stěny. Obě léčiva působí na replikující se i nereplikující se bakterie. Delamanid je registrován i v ČR jako LP Deltyba®<sup>84</sup>. Další novější látkou těchto chemoterapeutik je TBA-354 v klinickém testování<sup>35</sup>.

## Nová léčiva v terapii TBC



## 4 Experimentální část

### 4.1 Použité chemikálie, přístroje a metody

Veškeré použité reagenty a chemikálie (pokud není uvedeno jinak) byly nakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) a dodány byly v kvalitě certifikované dodavatelem. Výchozí látky 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina, 2-chloro-4-(5-chloropyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina, 4-(5-chloropyrazin-2-karboxamido)-2-methoxybenzoová kyselina a 2-chloro-4-(5-chloropyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina byly převzaty od Dr. Zitka na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv anebo nasyntetizovány v čas potřeby.

Nově připravené sloučeniny byly vytvořeny v laboratořích katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (KFCHFA) na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové.

Meziprodukty a konečné sloučeniny pak byly kontrolovány pomocí TLC chromatografie. Byly použity TLC desky Silica 60 F254 patřící do portfolia společnosti Merck (Darmstadt, Německo).

Výsledné produkty byly vyhodnoceny a vyčištěny chromatograficky na přístroji CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím chromatografické kolony se silikagelem Kieselgel 60, 0,040 až 0,063  $\mu\text{m}$  (Merck, Darmstadt, Německo). Při detekci byl využit UV-VIS detektor při vlnových délkách 254 nm a 280 nm.

IČ spektra byla změřena spektrofotometricky Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) za použití metody ATR (zeslabený vnitřní odraz) na germaniovém krystalu.

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla získána na přístroji Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) při frekvenci 500 MHz pro <sup>1</sup>H a 125 MHz pro <sup>13</sup>C. Tato spektra byla změřena v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) Chemické posuny δ (ppm) se vztahují k tetramethylsilanu (TMS) přes výchozí signály daného deuterovaného rozpouštědla (DMSO-*d*<sub>6</sub> 2,50 ppm v <sup>1</sup>H spektru a 39,70 ppm v <sup>13</sup>C spektru). V <sup>13</sup>C spektru u některých látek chybí signál aromatického uhlíku v oblasti 130–132 ppm – v důsledku překryvu ostatními signály. V <sup>1</sup>H spektru čárkované vodíky (H3', H6') značí vodíky pyrazinového jádra, ArH pak označuje vodíky benzenového jádra.

Teploty tání produktů byly změřeny metodou otevřené kapiláry pomocí bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Velká Británie) a tyto hodnoty nejsou zkorigovány.

Elementární analýza sloučenin byla změřena pomocí analyzátoru Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Německo).

Pro výpočet hodnot log *P*, CLog*P* a tvorbu vzorců byl použit PC program CS ChemBioDraw Professional 17.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) Výsledné výtěžky se vztahují k chromatograficky čistému produktu po všech čistících operacích.

## 4.2 Syntéza výchozích látek

Za první prekurzor syntézy výchozí látky se dá považovat 5-chlopyrazin-2-karboxylová kyselina, který následně reaguje s SOCl<sub>2</sub> (thionyl chloridem) za vzniku chloridu mechanismem nukleofilní substituce, poté následuje reakce acylace aminoskupiny *p*-aminobenzoové kyseliny, aby vznikl námi požadovaný karboxamid.

### JZ-OZ-1

#### Viz. Schéma 1, R<sup>1</sup> = OH

Do baňky s kulatým dnem (250 ml) navážíme 2022,5 mg (12,8 mmol) kyseliny 5-chloropyrazin-2-karboxylové a dispergujeme ji ve 30 ml bezvodého toluenu. Přidáme 6 ml thionylchloridu a 2 kapky *N,N*-dimethylformamidu. Baňku opatříme míchadlem a umístíme do lázně pod zpětný chladič. Hodinu zahříváme na 105 °C. Výchozí kyselina se postupně rozpouští, směs se barví do červenohněda. Po skončení reakce na vakuové odparce oddestilujeme toluen a přebytek thionylchloridu. Ke kapalnému zbytku přidáme malé množství bezvodého toluenu a opět oddestilujeme. Toto zopakujeme ještě dvakrát. Tento postup slouží ke zbavení se posledních stop reaktivního thionylchloridu. Červenohnědý kapalný zbytek (surový chlorid kyseliny) rozpustíme ve 30 ml bezvodého acetonu.

V druhé reakční nádobě se společně nechá rozpustit 1760,4 mg (11,5 mmol) *p*-aminosalicylové kyseliny v prostředí acetonu s 909 mg (11,5 mmol) pyridinu. Připravený roztok chloridu kyseliny za stálého míchání a chlazení ledem postupně (asi během 10 minut tak, aby se směs nepřehřívala) přikapeme do roztoku PAS a dále ponecháme ještě 1 hodinu míchat při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce odstraníme aceton na odparce za sníženého



tlaku (oddestilujeme do sucha). Pevný zbytek opakovaně na filtru promyjeme vodou. Vzniklým produktem je 2-hydroxy-4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoová (Schéma 1,  $R^1 = OH$ ). Produkt vysušíme.

### JZ-OZ-15

Viz. Schéma 1,  $R^1 = H$

Podobným postupem uvedeným ve Schématu 1 se připravuje i druhá výchozí látka označená JZ-OZ-15. 1585,4 mg (10 mmol) výchozí látky 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny se nechá zreagovat s 5 ml  $SOCl_2$  s přikápnutím 2 kapek DMF jako katalyzátoru na meziproduct chlorid kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové, tato reakce probíhá v prostředí toluenu při teplotě  $105^\circ C$  po dobu 1h. V druhé reakční nádobě se společně rozpustí 1371,4 mg (10 mmol) *p*-aminobenzoové kyseliny v prostředí acetonu s 791 mg (10 mmol) pyridinu. Připravený roztok chloridu kyseliny za stálého míchání a chlazení ledem postupně (asi během 10 minut tak, aby se směs nepřehřívala) přikapeme do roztoku PAS a dále ponecháme ještě 1 hodinu míchat při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce odstraníme aceton na odparce za sníženého tlaku (oddestilujeme do sucha). Pevný zbytek opakovaně na filtru promyjeme vodou. Vzniklým produktem je 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina (Schéma 1,  $R^1 = H$ ).

Zbývající výchozí látky s  $R^1 = Cl$ ,  $R^1 = CH_3$  a  $R^1 = OCH_3$  byly dodány z laboratoře Dr. Zitka na KFCHFA Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

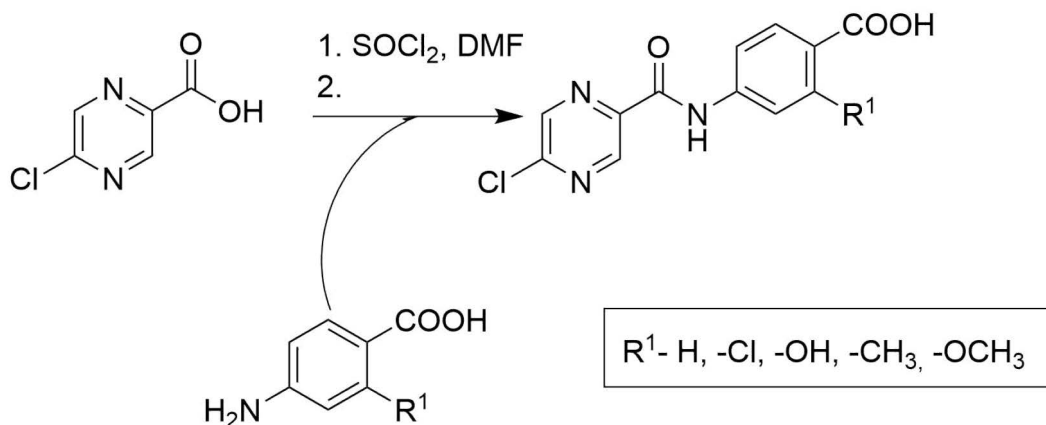


Schéma 1: Příprava výchozích látek (JZ-OZ-1 a JZ-OZ-15). Reakce 5-chlorpyrazinkarboxylové kyseliny a substituované kyseliny 4-aminobenzoové.

### JZ-OZ-8-1

Základním prekurzorem pro další výchozí látku byla sloučenina 4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina. 300 mg (2 mmol) tohoto prekurzoru reagovalo s 544,1 mg (2 mmol) fosforečnanu draselného a 0,613 ml (9,4 mmol) dichlormethanu (DCM). Látku jsme rozpustili asi v 5 ml DMF<sup>85</sup>. Směs jsme nechali reagovat 10 h pod zpětným chladičem při teplotě  $100^\circ C$  za postupného přidávání DCM, který se ze směsi odpařoval. Přidali jsme 5 ml  $H_2O$  a případně upravili pomocí 5 % HCl na  $pH=7$ . Vysrážel se produkt, který

jsme promyli vodou na fritě. Část pevného produktu jsme zachytili na filtru a část zbyla ve vodné fázi s DMF. Tuto fázi jsme extrahovali vytřepáváním do EtOAc. Pevný produkt zachycený na fritě jsme také rozpustili v EtOAc. Odpařením rozpouštědla na vakuové odparce jsme produkt naadsorbovali na silikagel. Následně bylo nutné přečistit produkt pomocí FLASH chromatografie na přístroji CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím chromatografické kolony se silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Při chromatografii byla použita mobilní fáze ethyl-acetát: hexan s AcOH 2 % v režimu gradientové eluce. Při detekci byl využit UV-VIS detektor při vlnové délce 280 nm. Čistý produkt byl získán pomocí vakuové odparky. Vzniklou výchozí látkou byla sloučenina 7-amino-4,8-dihydro-4*H*-benzo[d][1,3]dioxin-4-on (JZ - OZ- 8.1) (Schéma 2).

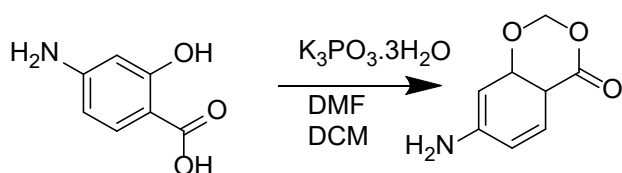


Schéma 2: Reakce přípravy 7-amino-4,8-dihydro-4*H*-benzo[d][1,3]dioxin-4-onu (JZ-OZ-8-1)

### 4.3 Syntéza finálních produktů

Syntéza výsledných produktů s případným aminem probíhá jako nukleofilní substituce díky halogovanému kruhu při 120 °C v prostředí DMSO v mikrovlnném reaktoru. Dalším způsobem je syntéza pod zpětným chladičem (zahřívání na olejové lázni) po dobu přibližně 10 h při teplotě 140 °C (Schéma 3.)<sup>86</sup>.

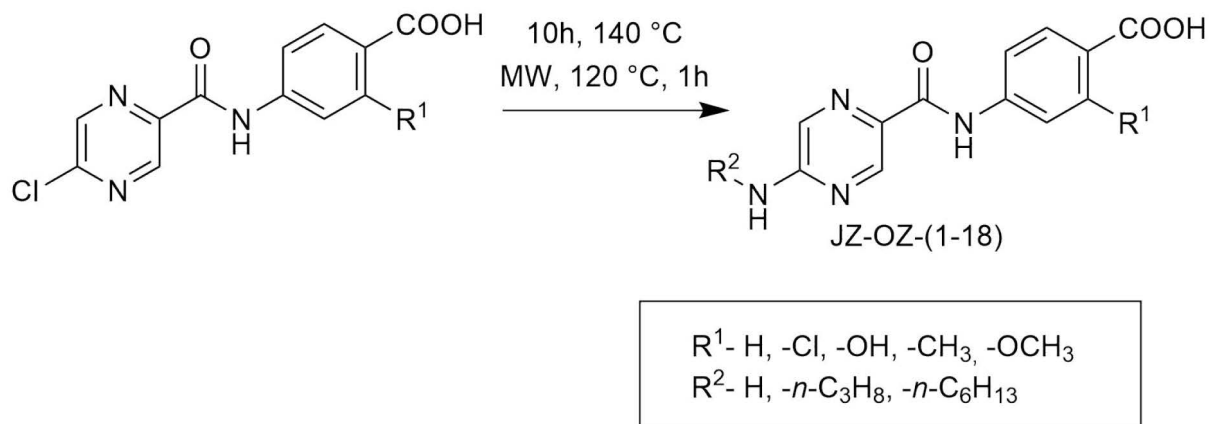


Schéma 3: Nukleofilní substituce pyrazinového kruhu karboxamidů

### 4.3.1 Postup přípravy jednotlivých derivátů substituované 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

#### *JZ-OZ-2*

K 299,5 mg (1,02 mmol) výchozí látky (JZ-OZ-1) jsme přidali 181,3 mg (10,2 mmol, 10 mol. ekvivalentů) propylaminu s přidavkem 2 ml DMSO (dimethylsulfoxid) a nechali jsme reagovat jednu hodinu v mikrovlnném reaktoru při 140 °C. Po ukončení reakce a vychladnutí do reakční směsi přidáme asi 10 ml H<sub>2</sub>O a okyselíme HCl přibližně na pH=3. V reakční směsi precipitoval produkt. Produkt jsme odfiltrovali na fritě. Pevný produkt byl opětovně rozpuštěn v EtOAc a opakovaně protřepán 5% roztokem kyseliny chlorovodíkové. Rozpuštěný produkt zůstal ve fázi s EtOAc. Spojené organické podíly se zfiltrovaly přes bezvodý síran sodný. Po odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku byl získán pevný produkt.

#### *JZ-OZ-3*

201,8 mg (0,65 mmol) (2-chlor-4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny, kterou dodal Dr. Zitko ze své laboratoře na KFCHFA, zreagovalo s 382 mg (6,5 mmol, 10 mol. ekviv.) propylaminu s přidáním 2 ml DMSO (dimethylsulfoxid) v mikrovlnném reaktoru po dobu 1h při teplotě 130 °C. Vzniklé TLC téměř odpovídalo čistému produktu. Do reakční směsi přidáme asi 10 ml H<sub>2</sub>O a okyselíme HCl přibližně na pH=3, v reakční směsi precipitoval produkt, který byl odsán na fritě a promyt vodou. Pevný produkt byl opětovně rozpuštěn v EtOAc a opakovaně protřepán 5 % roztokem kyseliny chlorovodíkové. Rozpuštěný produkt zůstal ve fázi s EtOAc. Spojené organické podíly se zfiltrovaly přes bezvodý síran sodný. Po odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku byl získán pevný produkt.

#### *JZ-OZ-4*

K 203 mg (0,65 mmol) výchozí látky použité i u JZ-OZ-3 dodané Dr. Zitkem z KFCHFA jsme přidali 197,4 mg (1,99 mmol) hexylaminu a nechali reagovat 10 h pod zpětným chladičem při 140 °C. Do reakční směsi přidáme asi 10 ml H<sub>2</sub>O a okyselíme HCl přibližně na pH=3, v reakční směsi precipitoval produkt, po odsátí na fritě jsme produkt rozpustili v EtOAc a odpařením rozpouštědla za sníženého tlaku naadsorbovali na silikagel. Následně bylo nutné přečistit produkt pomocí FLASH chromatografie na přístroji CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím chromatografické kolony se silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Při chromatografii byla použita mobilní fáze methanol (0–30 %) v EtOAc s přidavkem AcOH 2 % v režimu gradientové eluce. Při detekci byl využit UV-VIS detektor při vlnové délce 280 nm. Čistý produkt byl získán pomocí vakuové odparky.

### *JZ-OZ-5*

202,3 mg (0,69 mmol) výchozí látky (JZ-OZ-1) rozpustíme v 2 ml DMSO, přidáme 210,7 mg (2,07 mmol) hexylaminu a necháme proběhnout reakci za reakčních podmínek při zpětném chlazení, které jsou následující: 140 °C, 10 h. Do reakční směsi přidáme asi 10 ml H<sub>2</sub>O a okyselíme HCl přibližně na pH=3, v reakční směsi precipitoval produkt, po odsátí na fritě, promytí vodou a vysušení získáme pevný produkt.

### *JZ-OZ-6*

1007,8 mg (3,43 mmol) prekurzoru produktu JZ-OZ-1 přidáme k 10 g (97,9 mmol) acetanhydridu, přikápneme 5 kapek H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, necháme míchat 2 h pod zpětným chladičem při teplotě 140 po dobu 10 h<sup>87</sup>. Do reakční směsi jsme poté přidali asi 20 ml vody k neutralizaci acetanhydridu. Následně jsme tuto směs vytřepali do ethyl-acetátu (EtOAc) a nechali odpařit na vakuové odparce. Pak bylo nutné přechistit produkt pomocí FLASH chromatografie na přístroji CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím chromatografické kolony se silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Pro chromatografii byla použita mobilní fáze ethyl-acetát: hexan s AcOH 2 % v režimu gradientové eluce. Při detekci byl využit UV-VIS detektor při vlnové délce 280 nm. Pro dokonalé vyčištění produktů se tento postup opakoval dvakrát. Čistý produkt byl získán pomocí vakuové odparky. Tato látka se nepodařilo vyčistit, dle NMR se jedná o směs výchozí látky a acetylovaného produktu. Charakterizace této směsi není v diplomové práci dále uvedena.

### *JZ-OZ-8-2*

301 mg (1,9 mmol) výchozí látky 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny se nechá zreagovat s 1 ml SOCl<sub>2</sub> s přikápnutím 2 kapek DMF jako katalyzátoru na meziproduct chlorid kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové, tato reakce probíhá v prostředí toluenu při teplotě 105°C po dobu 1 h. Ve druhé reakční baňce se rozpustí 281 mg (1,7 mmol) výchozí látky JZ-OZ- 8-1 v prostředí acetonu, kdy poté je nutné přidat 404 mg (5,1 mmol) pyridinu (Schéma 4.). Obsah první reakční baňky se za stálého chlazení přidá ke směsi s výchozí látkou 8-1.

Rozpouštědla je nutno odpařit na vakuové odparce, následně produkt ve formě pevné látky promýt vodou, aby došlo k odstranění zbylého pyridinu a odfiltrovat na fritě. Pak se rozpustí v EtOAc a naadsorbuje se odpařením na silikagel. Opět bylo nutné přechistit produkt pomocí FLASH chromatografie na přístroji CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím chromatografické kolony se silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Pro chromatografii byla použita mobilní

fáze ethyl-acetát: hexan s AcOH 2 % v režimu gradientové eluce až do hodnoty 100 % EtOAc v mobilní fázi. Při detekci byl využit UV-VIS detektor při vlnové délce 280 nm. Po odpaření reakční směsi jsme produkt rekrystalizovali z methanolu s přidávkou DMSO jako kosolvens. Přidáme asi 10 ml H<sub>2</sub>O a okyselíme HCl přibližně na pH=3, ve směsi precipitoval produkt, po přefiltrování na fritě jsme výsledný produkt promyli vodou a zachytili na filtru.

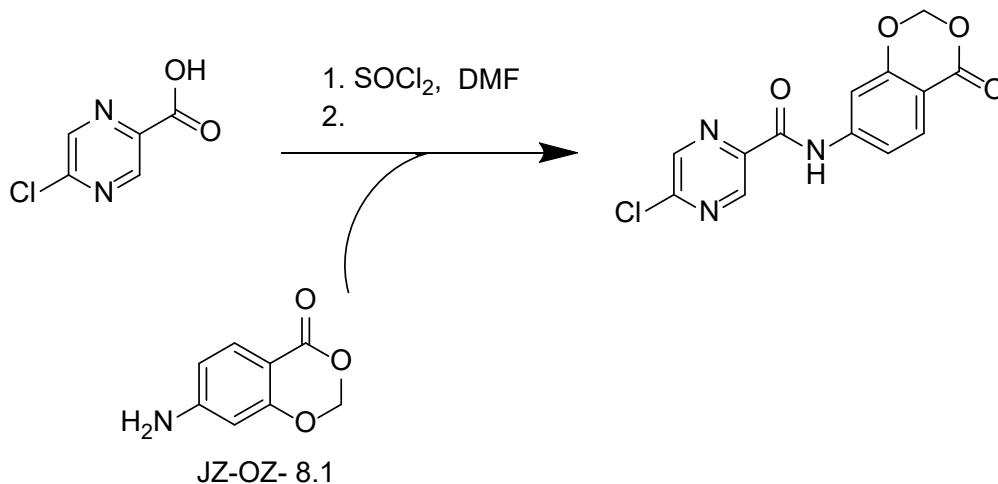


Schéma 4: Příprava 5-chlor-*N*-(4-oxo-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-7-yl)pyrazin-2-karboxamidu (JZ-OZ-8-2)

### JZ-OZ-9

K 204,5 mg (0,66 mmol) 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-methoxybenzoové kyseliny dodané Dr. Zitkem z laboratoře KFCHFA bylo nutné přidat 1100 mg (18,6 mmol) propylaminu. Reakční směs se vložila do mikrovlnného reaktoru a po dobu 45 minut při teplotě 120 °C se zde nechala probíhat reakce. Po ukončení procesu v mikrovlnném reaktoru se do směsi přidalo 10 ml 10 % HCl a produkt se vytřepal do ethyl-acetátu. Pak následovala filtrace a vysušení bezvodým síranem sodným zakončené odpařením zbytkového rozpouštědla na vakuové odparce.

### JZ-OZ-11

K 312,11 mg (1 mmol) 2-chlor-4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoové kyselině, kterou dodal Dr. Zitko ze své laboratoře na KFCHFA, přidáme asi 2,5 g (36,70 mmol) 25% vodného roztoku amoniaku a 2,5 g methanolu a necháme reagovat v mikrovlnném reaktoru asi 1 h při teplotě 120 °C. Poté dojde k odpaření zbytkového amoniaku s methanolem na vakuové odparce, k pevnému podílu se přidá 5 ml 10% HCl a 5 ml H<sub>2</sub>O, směs se přefiltruje přes fritu za sníženého tlaku. Pevný podíl na filtru se rekrystalizuje z horkého DMSO, vysrážení přidávkou vody. Produkt po promytí vodou na fritě zůstal na filtru.

### *JZ-OZ-12*

K 291,69 mg (1 mmol) 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-methylbenzoové kyseliny, kterou dodal Dr. Zitko ze své laboratoře na KFCHFA, přidáme asi 2,5 g (36,70 mmol) 25% amoniaku v methanolu, kdy následně necháme probíhat reakci v mikrovlnném reaktoru po dobu asi 1 h při teplotě 120 °C. Poté dojde k odpaření zbytkového amoniaku s methanolem na vakuové odparce, k pevnému podílu se přidá 5 ml 10% HCl a 5 ml H<sub>2</sub>O, směs se přefiltruje přes fritu za sníženého tlaku. Pevný podíl na filtru se rekrystalizuje z horkého DMSO, přidání aktivního uhlí, které absorbovalo na svůj povrch nečistoty. Po odfiltrování aktivního uhlí se produkt vysrážel přidávkem vody. Po konečné filtraci produkt zůstal na fritě.

### *JZ-OZ-13*

K 291,69 mg (1mmol) 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-methylbenzoové kyseliny, kterou dodal Dr. Zitko ze své laboratoře na KFCHFA, přidáme asi 2,5 g (42,29 mmol) propylaminu. Dále se opakuje postup viz. *JZ-OZ-12*.

### *JZ-OZ-14*

K 291,69 mg (1mmol) 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-methylbenzoové kyseliny, kterou dodal Dr. Zitko ze své laboratoře na KFCHFA, přidáme asi 2,5 g (24,7 mmol) hexylaminu. Dále se opakuje postup viz. *JZ-OZ-12*.

### *JZ-OZ-16*

K 277,66 mg (1 mmol) *JZ-OZ-15*, nasyntetizované jako jednu z výchozích látek v předchozí části, přidáme 2,5 g (36,70 mmol) 25% vodného roztoku amoniaku a 2,5 g methanolu. V dalších krocích se opakuje postup viz. *JZ-OZ-12*.

### *JZ-OZ-17*

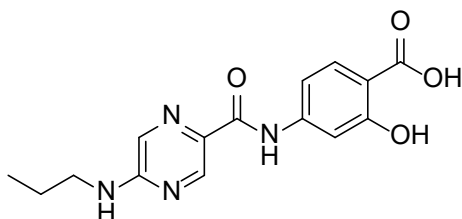
K 277,66 mg (1 mmol) *JZ-OZ-15*, nasyntetizované jako jednu z výchozích látek v předchozí části, přidáme 2,5 g (42,29 mmol) propylaminu. V dalších krocích se opakuje postup viz. *JZ-OZ-12*.

## JZ-OZ-18

K 277, 66 mg (1 mmol) JZ-OZ-15, nasyntetizované jako jednu z výchozích látek v předchozí části, přidáme 2,5 g (24,7 mmol) hexylaminu. V dalších krocích se opakuje postup viz. JZ-OZ-12.

### 4.4 Nově připravené látky

#### **JZ-OZ-2** – 2-hydroxy-4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 316,32

Log *P*: 0,79

CLog*P*: 3,40146

R<sub>f</sub> = 0,33

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 215,5–216,6 °C

Teoretický výtěžek: 322,6 mg

Praktický výtěžek: 153,5 mg (48%)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 56,96 %, H 5,10 %, N 17,71%

Nalezeno: C 56,83 %, H 5,06 %, N 17,70 %

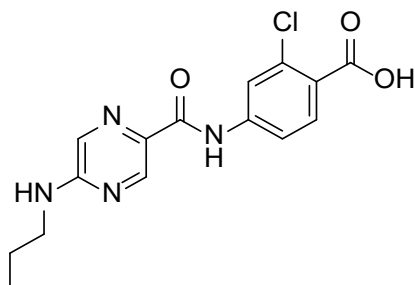
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.30 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3'), 7.99 – 7.89 (m, 2H, H6', NH), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.40 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, ArH), 3.30 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.63–1.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

COOH and OH neviditelné, výměna s rozpouštědlem

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.8, 163.1, 162.2, 156.5, 145.4, 143.6, 131.5, 130.9, 111.2, 108.0, 106.9, 42.3, 22.0, 11.6.

**IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>):** 3310 ν(OH, NH); 2966 ν(CH); 1701, 1655 ν(C=O); 1589; 1519; 1258; 1182; 1155; 1018; 906; 858; 784

**JZ-OZ-3** – 2-chlor-4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 334,76

Log *P*: 1,74

CLog*P*: 3,27795

R<sub>f</sub> = 0,39

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 237,2–238,5 °C

Teoretický výtěžek: 216,3 mg

Praktický výtěžek: 105,8 mg (49 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 53,82 %, H 4,52 %, N 16,74 %

Nalezeno: C 54,51 %, H 4,94%, N 15,02 %

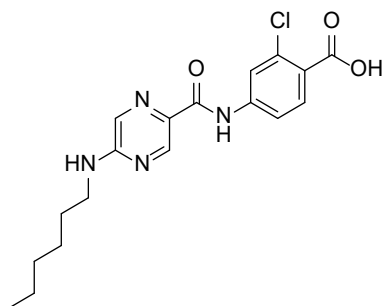
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.00 (bs, 1H, COOH), 10.52 (s, 1H, CONH), 8.65 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.18 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 8.00–7.87 (m, 3H, H6', NH, ArH), 7.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 3.41–3.21 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.67–1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.1, 163.3, 156.5, 143.8, 142.8, 133.0, 132.3, 131.3, 124.7, 121.3, 118.1, 42.3, 22.0, 11.6

**IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>):** 3380, 3335 ν(OH, NH); 2963, 2924, 2852 ν(CH); 1702, 1674 ν(C=O); 1590; 1515; 1387; 1274; 1225; 1198; 1012; 772



**JZ-OZ-4** – 2-chlor-4-(5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 376,84

Log *P*: 2,99

CLog*P*: 4,86495

R<sub>f</sub> = 0,64

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 216,1–217,8 °C

Teoretický výtěžek: 243,1 mg

Praktický výtěžek: 89,5 mg (37%)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 57,37 %, H 5,62 %, N 14,87 %

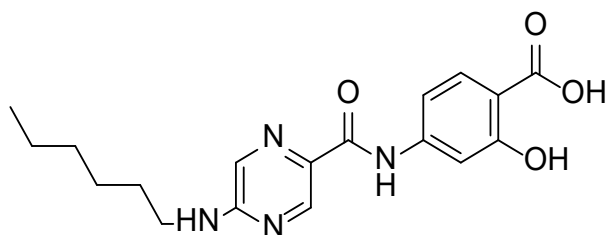
Nalezeno: C 56,39 %, H 5,19 %, N 14,54 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.28 (s, 1H, CONH), 8.63 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.07 – 7.92 (m, 3H, H6', NH, ArH), 7.72 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 3.32 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.61–1.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.40–1.15 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 169.8, 163.0, 156.5, 143.5, 140.1, 131.6, 131.3, 131.0, 120.7, 117.9, 40.6, 31.3, 28.8, 26.5, 22.4, 14.2.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3300 ν(OH, NH); 2930, 2860 ν(CH); 1690, 1671 ν(C=O); 1585; 1527; 1421; 1386; 1276; 1225; 1190; 1121; 1019; 829; 788

**JZ-OZ-5** – 4-(5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 358,40

Log *P*: 2,05

CLog*P*: 4,98846

R<sub>f</sub> = 0,44

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 242,3–243,8 °C

Teoretický výtěžek: 246,9 mg

Praktický výtěžek: 121,9 mg (49 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 60,32 %, H 6,19 %, N 15,63 %

Nalezeno: C 46,71 %, H 4,62 %, N 12,08 %

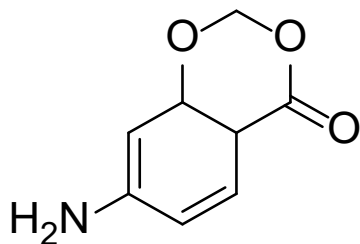
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.59\* (bs, 1H, OH), 11.35\* (bs, 1H, COOH), 10.31 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 7.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.41 (dd, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H, ArH), 3.32 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.59–1.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38–1.20 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

\* velmi široký signál, výměna s rozpouštědlem

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 171.8, 163.1, 162.2, 156.4, 145.4, 143.7, 131.4, 130.9, 111.2, 107.9, 106.9, 40.5, 31.2, 28.6, 26.3, 22.3, 14.1.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3308, 3288 ν(OH, NH); 2957, 2930, 2860 ν(CH); 1674, 1645 ν(C=O); 1593; 1537; 1455; 1395; 1200; 1164; 1011; 777

**JZ-OZ- 8.1** – 7-amino-4a,8a-dihydro-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-4-on



Sumární vzorec: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 167,16

Log *P*: -0,99

CLog*P*: -0,5202

R<sub>f</sub> = 0,83

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 119,3–120,0 °C (dle literatury <sup>85</sup> 113–115 °C)

Teoretický výtěžek: 3274,7 mg

Praktický výtěžek: 1274,2 (39 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 58,18 %, H 4,27 %, N 8,48 %

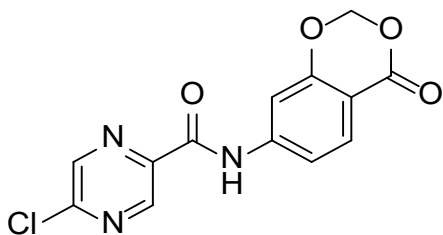
Nalezeno: C 58,45 %, H 4,09 %, N 8,58 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, ArH), 6.44 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.38 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, ArH), 6.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, ArH), 5.61 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161.6, 160.2, 156.7, 131.4, 110.3, 101.2, 97.6, 90.8.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3462, 3359, 3242 ν(OH, NH); 1707 ν(C=O); 1601; 1284; 1193; 1068;

**JZ-OZ- 8.2** – 5-chlor-*N*-(4-oxo-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-7-yl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 305,67

Log *P*: 1,22

CLog*P*: 1,77146

R<sub>f</sub> = 0,83

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 243,9–245,8 °C

Teoretický výtěžek: 519,9 mg

Praktický výtěžek: 334,9 mg (64 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 51,08 %, H 2,64 %, N 13,75 %

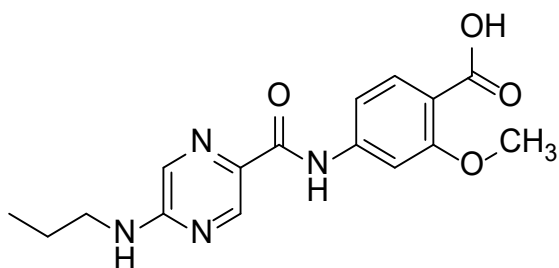
Nalezeno: C 37,43 %, H 1,66 %, N 10,13 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.20 (s, 1H, CONH), 9.12 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.94 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H6'), 7.92–7.74 (m, 3H, ArH), 5.82 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162.0, 160.9, 158.9, 151.5, 145.4, 144.5, 143.4, 143.2, 130.7, 115.8, 110.2, 107.1, 91.5

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3335 ν(OH, NH); 1736, 1686 ν(C=O); 1593; 1515; 1419; 1280; 1241; 1183; 1132; 1059; 1017; 864; 779

**JZ-OZ-9** – 2-methoxy-4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

Molekulová hmotnost: 330,34

Log *P*: 1,06

CLog*P*: 2,68606

R<sub>f</sub> = 0,61

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 191,1–192,2 °C

Teoretický výtěžek: 219, 7 mg

Praktický výtěžek: 163 mg (74 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 58,17 %, H 5,49 %, N 16,96 %

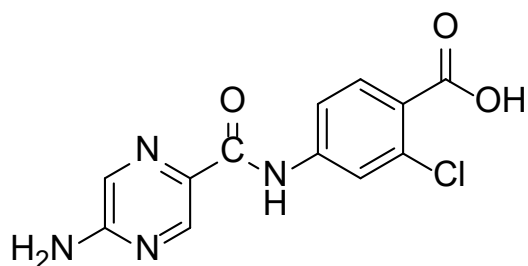
Nalezeno: C 58,21 %, H 5,33 %, N 16,58 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 12.25 (bs, 1H, COOH), 10.30 (s, 1H, CONH), 8.65 (s, 1H, H3'), 7.96 (s, 1H, H6'), 7.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.76 (s, 1H, ArH), 7.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.41–3.16 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.65–1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.7, 163.0, 159.5, 156.5, 143.8, 143.5, 132.3, 131.5, 115.0, 111.1, 103.7, 55.8, 42.3, 22.0, 11.7, 11.6.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3332 ν(OH, NH); 2965, 2879 ν(CH); 1731, 1674 ν(C=O); 1588; 1521; 1411; 1360; 1257; 1197; 1127; 1020; 845;

**JZ-OZ-11** – 4-(5-aminopyrazin-2-karboxamido)-2-chlorbenzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 292,68

Log *P*: 0,62

CLog*P*: 1,39361

R<sub>f</sub> = 0,39

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 265,3–266,4 °C

Teoretický výtěžek: 292,7 mg

Praktický výtěžek: 92,4 mg (32 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 49,25 %, H 3,10 %, N 19,14 %

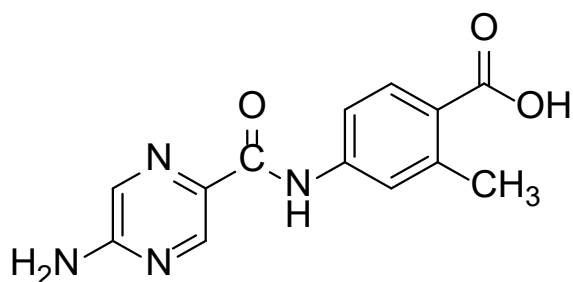
Nalezeno: C 50,09 %, H 3,11 %, N 17,79 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.06 (bs, 1H, COOH), 10.54 (s, 1H, CONH), 8.62 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 8.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.94–7.89 (m, 2H, H<sub>6'</sub>, ArH), 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.31 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.2, 163.2, 157.8, 144.0, 142.8, 133.0, 132.3, 132.1, 130.3, 124.8, 121.3, 118.1.

Ī (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3428, 3349, 3157 ν(OH, NH); 1682, 1638 ν(C=O); 1591; 1516; 1383; 1291; 1227; 1124; 1016; 856; 775

**JZ-OZ-12** – 4-(5-aminopyrazin-2-karboxamido)-2-methylbenzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 272,26

Log *P*: 0,55

CLog*P*: 1,43917

R<sub>f</sub> = 0,62

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 270,3–272,5 °C

Teoretický výtěžek: 272,3 mg

Praktický výtěžek: 159 mg (58 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 57,35 %, H 4,44 %, N 20,58 %

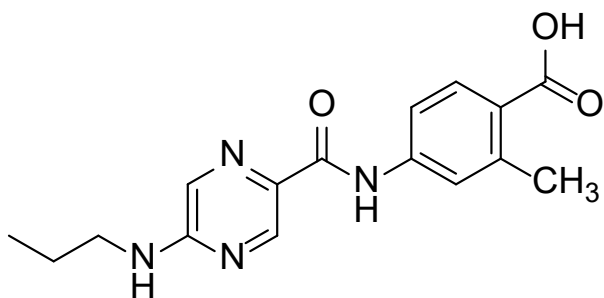
Nalezeno: C 56,48 %, H 4,22 %, N 19,96 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.57 (bs, 1H, COOH), 10.25 (s, 1H, CONH), 8.62 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.92 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.86–7.76 (m, 3H, ArH), 7.28 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.2, 162.8, 157.8, 143.7, 142.0, 140.7, 132.4, 131.7, 130.3, 124.8, 122.4, 117.0, 22.1.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3390, 3340, 3131 ν(OH, NH); 1684, 1655 ν(C=O); 1583; 1537; 1408; 1295; 1242; 1019; 878; 777

**JZ-OZ-13** – 2-methyl-4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 314,35

Log *P*: 1,67

CLog*P*: 3,3235

R<sub>f</sub> = 0,67

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 262,3–264,8 °C

Teoretický výtěžek: 314,4 mg

Praktický výtěžek: 120 mg (38%)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 61,14 %, H 5,77 %, N 17,82 %

Nalezeno: C 60,22 %, H 5,70 %, N 17,56 %

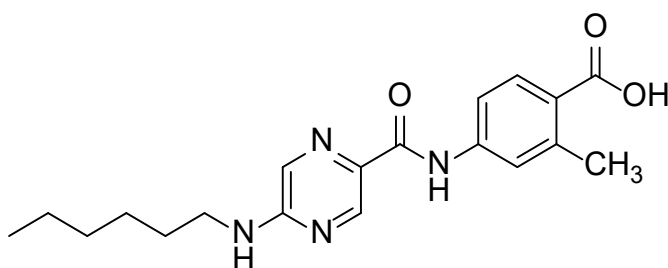
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.54 (bs, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.96 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.86 – 7.76 (m, 3H, ArH), 3.45–3.22 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.65–1.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.2, 162.9, 156.4, 143.4, 142.0, 140.7, 131.7, 131.6, 124.7, 122.3, 116.9, 42.3, 22.1, 22.0, 11.6.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3553, 3325, 3267 ν(OH, NH); 2978 ν(CH); 1673, 1641 ν(C=O); 1605; 1518; 1390; 1236; 1018; 858; 784



**JZ- OZ- 14** – 4-(5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamido)-2-methylbenzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 356,43

Log *P*: 2,92

CLog*P*: 4,9105

R<sub>f</sub> = 0,72

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 228–230,6 °C

Teoretický výtěžek: 356,4 mg

Praktický výtěžek: 242 mg (68 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 64,03 %, H 6,79 %, N 15,72 %

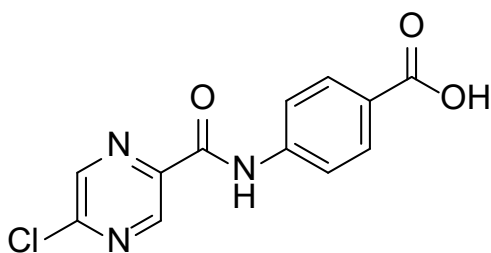
Nalezeno: C 64,20 %, H 7,27 %, N 15,79 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.53 (bs, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, CONH), 8.64 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 7.95 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.88 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.85 – 7.77 (m, 3H, ArH), 3.39 – 3.26 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.59–1.49 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38–1.20 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 168.2, 162.9, 156.4, 143.4, 142.0, 140.7, 131.7, 131.5, 124.8, 122.3, 116.9, 40.5, 31.2, 28.7, 26.3, 22.3, 22.2, 22.1, 14.1.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3335 ν(OH, NH); 2956, 2930, 2858 ν(CH); 1674 ν(C=O); 1592; 1522; 1396; 1289; 1242; 1193; 1012; 779

**JZ- OZ- 15** – 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 277,66

Log *P*: 1,05

CLog*P*: 1,9692

R<sub>f</sub> = 0,70

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 291,3–293,8 °C

Teoretický výtěžek: 2776,6 mg

Praktický výtěžek: 2255,3 mg (81%)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 51,91 %, H 2,90 %, N 15,13 %

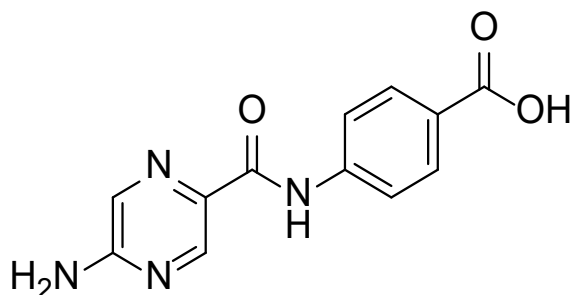
Nalezeno: C 51,30 %, H 3,11 %, N 14,71 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.75 (bs, 1H, COOH), 11.02 (s, 1H, CONH), 9.13 (s, 1H, H3'), 8.95 (s, 1H, H6'), 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.0, 161.5, 151.3, 144.4, 143.8, 143.1, 142.3, 130.4, 126.4, 120.2.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3352 ν(OH, NH); 1683 ν(C=O); 1591; 1518; 1410; 1297; 1183; 1140; 1026; 858; 772

**JZ- OZ- 16** – 4-(5-aminopyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 258,24

Log *P*: 0,06

CLog*P*: 1,24017

R<sub>f</sub> = 0,51

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 301,5–305,3 °C

Teoretický výtěžek: 258,2 mg

Praktický výtěžek: 31 mg (12 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 55,81 %, H 3,90 %, N 21,70 %

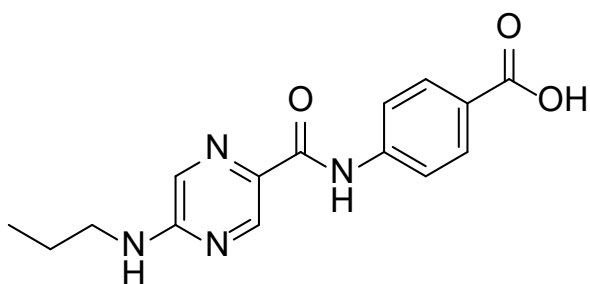
Nalezeno: C 55,49 %, H 3,70 %, N 21,23 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.71 (bs, 1H, COOH), 10.40 (s, 1H, CONH), 8.62 (s, 1H, H3'), 8.02–7.86 (m, 5H, H6', ArH), 7.29 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.2, 162.9, 157.8, 143.8, 143.0, 132.4, 130.3, 130.3, 125.5, 119.5.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3382, 3353, 3152 ν(OH, NH); 1676 ν(C=O); 1590; 1530; 1408; 1274; 1236; 1176; 1085; 1020; 850; 769

**JZ- OZ- 17** – 4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 300,32

Log *P*: 1,18

CLog*P*: 3,1245

R<sub>f</sub> = 0,56

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 251,3–255,8 °C

Teoretický výtěžek: 300,3 mg

Praktický výtěžek: 166,5mg (55 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 59,99 %, H 5,37 %, N 18,66 %

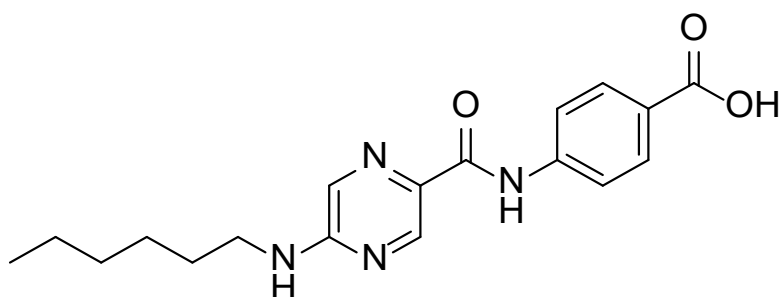
Nalezeno: C 59,74 %, H 5,31 %, N 18,59 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.69 (bs, 1H, COOH), 10.37 (s, 1H, CONH), 8.66 (s, 1H, H3'), 8.01–7.87 (m, 6H, H6', NH, ArH), 3.43–3.23 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.63–1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.92 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.1, 163.0, 156.4, 143.5, 143.1, 131.6, 130.4, 130.3, 125.4, 119.4, 42.3, 22.0, 11.6.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3337 ν(OH, NH); 2965, 2878 ν(CH); 1670 ν(C=O); 1589; 1526; 1410; 1360; 1273; 1243; 1196; 1011; 874; 769

**JZ- OZ- 18** – 4-(5-(hexylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Sumární vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>

Molekulová hmotnost: 342,40

Log *P*: 2,43

CLog*P*: 4,7115

R<sub>f</sub> = 0,61

Mobilní fáze: EtOAc: MeOH – 9:1 s přidavkem 1 % AcOH

Teplota tání: 210,7–215,8 °C

Teoretický výtěžek: 342,4 mg

Praktický výtěžek: 144,5 mg (42 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 63,14 %, H 6,48 %, N 16,36 %

Nalezeno: C 63,44 %, H 6,60 %, N 15,74 %

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.68 (bs, 1H, COOH), 10.36 (s, 1H, CONH), 8.65 (s, 1H, H3'), 8.01–7.85 (m, 6H, H6', NH, ArH), 3.37–3.29 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.61–1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38–1.19 (m, 6H, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 0.85 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 167.1, 163.0, 156.4, 143.5, 143.1, 131.5, 130.4, 130.3, 125.4, 119.4, 40.5, 31.2, 28.7, 26.3, 22.3, 14.1.

IČ (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>): 3340 ν(OH, NH); 2954, 2932, 2870 ν(CH); 1668 ν(C=O); 1587; 1527; 1412; 1273; 1176; 1012; 851; 771

## 4.5 Biologické testování látek

### 4.5.1 Antimykobakteriální aktivita sloučenin

Antimykobakteriální aktivita (kromě *M. smegmatis*) byla změřena ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Vlastní aktivita *M. smegmatis* byla zkoumána Dr. Jand'ourkem, Ph.D. v laboratořích Katedry lékařských a biologických věd Farmaceutické fakulty, která je jednou z fakult Univerzity Karlovy v Praze.

*M. kansasii* CNCTC My 235/80 (ATCC 12478), *M. avium ssp. avium* CNCTC My 80/72 (ATCC 15769) byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika. Médium Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) bylo obohaceno 0,4 % (v/v) glycerolu (Sigma-Aldrich) a následně byl přidán 10 % (v/v) roztok OADC (kyselina olejová, albumin, dextróza, kataláza) pocházejícího z Bombaje (Indie) stanoveného pH = 6,6. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO, byla přidána živná půda (25 ul roztoku DMSO v 4,475 ml kultivačního média) a umístěny (100 ul) do mikrotitračních jamek. Mykobakterie byly suspendovány v izotonickém roztoku NaCl a hustota byla nastavena na 0,5-1,0 dle stupnice McFarlanda. Tyto suspenze byly zředěny 10:1 a použity k inokulaci testovacích jamek přidáním 100 µl mykobakteriální suspenze na jamku. Výsledné koncentrace testovaných sloučenin v jamkách byly 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 a 1,56 µg.ml<sup>-1</sup>. Inkubace probíhala v tmavé, vlhké atmosféře při teplotě 37 ° C. Po pěti dnech bylo přidáno 30 µl Alamar Blue (stejně objemové díly 0,01% sodné soli resazurinu (vodný roztok) a 10% Tweenu 80)). Výsledky byly potom stanoveny po 24 hodinách inkubace. Minimální inhibiční koncentrace (MIC, µg / ml) byla stanovena jako nejnižší koncentrace, která zabraňuje změně barvy modré na růžovou viditelně pouhým okem.

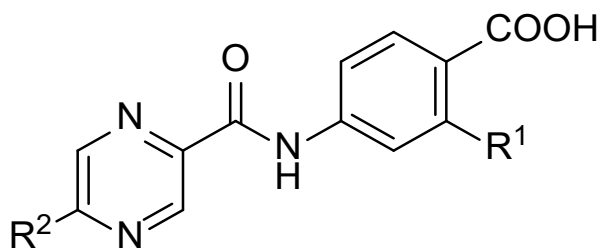
Látky byly dále testovány na aktivitu proti *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo). Aktivita se stanovovala pomocí mikrodiluční bujónové metody s použitím mikrotitračních destiček. Použitým médiem byl bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10% růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie). Růstový doplněk obsahoval albumin, kyselinu olejovou, dextrosu a katalasu. Konečná hustota suspenze byla nastavena na hodnotu v rozmezí od 0,5 do 1,0 podle McFarlandovy stupnice a zředěna poměrem 1:20 se živnou půdou.

Připravené sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) Testované látky se vztahovaly k standardům, jimiž byly isoniazid, rifampicin a ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Konečné koncentrace byly dosaženy binárním zředěním a přidáním mykobakteriální suspenze a stanoveny jako 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91 µg.ml<sup>-1</sup> s výjimkou standardů rifampicinu, kde konečné koncentrace byly 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 a 0,098 µg.ml<sup>-1</sup>. U ciprofloxacinu pak byly zvoleny tyto konečné koncentrace: 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156, 0,0078 µg.ml<sup>-1</sup>. Konečná koncentrace DMSO nepřesáhla 2,5 % (v / v) a neměla jakýkoliv vliv na mykobakterie.

Destičky byly zakryty polyesterovou lepicí fólií a inkubovány bez přístupu světla při 37 °C. Barvení se provádí smícháním 0,02 % sodné soli resazurinu a 10 % vodného roztoku Tween 80 (obě sloučeniny Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Kapaliny byly smíchány s použitím stejných objemů a následně přefiltrovány přes membránový bakteriální filtr. Mikrotitrační desky byly potom inkubovány dvě a půl hodiny pro stanovení aktivity proti *M. smegmatis* a čtyři hodiny pro *M. aurum*.

Výsledná aktivita byla znázorněna jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnota byla získána na podkladu barevné změny. Růžová barva značí neaktivní sloučeninu, kdežto modrá značí vykázanou aktivitu proti mykobakteriím. Hodnoty MIC pro zvolené standardy byly v rozmezí 7,81–15,625  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro isoniazid, 12,5–25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro rifampicin a 0,06525–0,125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro ciprofloxacin proti *M. smegmatis*, 1,95–3,91  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro isoniazid, 0,78–1,56  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro rifampicin a 0,00781–0,01563  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro ciprofloxacin proti *M. aurum*.

**Tab. č. 1:** Antimykobakteriální aktivita nových látek v MIC ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ve srovnání se standardy. Látky řazeny dle substituentu na pyrazinovém jádru, případně u JZ-OZ-8-1 se jedná o substituent na 4,8-dihydro-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-4-on.



Obecná struktura

	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	<i>M. smeg.</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. tbc</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kans.</i>
OZ8-2	5-Cl	-	≥ 500	≥ 500	1,56	>100	25
OZ15	5-Cl	H	≥250	125	>50	>50	>50
30*	5-Cl	OH	n.t.	n.t.	3,13	>100	n.t.
OZ11	5-NH <sub>2</sub>	Cl	≥ 500	≥ 500	12,5	>100	>100
OZ12	5-NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	>100	>100	>100
OZ16	5-NH <sub>2</sub>	H	n.t.	n.t.	>50	>50	>50
OZ2	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	OH	250	≥ 500	1,56/ 0,78**	>100/ >25	>100/ >25
OZ3	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	Cl	≥ 500	250	1,56/ >25**	100/ >25	>100/ >25
OZ9	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	OCH <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	12,5	>100	>100
OZ13	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	CH <sub>3</sub>	≥ 500	≥ 500	100	>100	>100
OZ17	5- NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	H	≥ 500	250	>100	>100	>100
OZ4	5-NH- <i>n</i> - C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Cl	250	250	12,5	100	>100
OZ5	5-NH- <i>n</i> - C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	OH	125	125	1,56	>100	100
OZ14	5-NH- <i>n</i> - C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>3</sub>	62,5	62,5	12,5	>100	25
OZ18	5-NH- <i>n</i> - C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	H	≥ 500	≥ 500	12,5	>100	>100
OZ8-1	-	-	≥ 125	≥ 125	1,56	25	6,25
INH			7,81– 15,625	3,91	0,2 – 0,39	6,25–12,5	6,25–25
CPX			6,25×10 <sup>-3</sup> – 125×10 <sup>-3</sup>	7,81×10 <sup>-3</sup> – 156,3×10 <sup>-3</sup>			
RFM			6,25–25	1,56			

\*reference na původní vědecký článek <sup>1</sup>

\*\* U OZ-2 a OZ-3 proběhla dvě testování proti *M.tbc*

n.t. - netestováno



**Tab. č. 2:** Antimykobakteriální aktivita připravených sloučenin proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv vyjádřená jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>				
	H	Cl	OH	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
chlor	>50	50**	3,13	>100**	>100**
amino	>50	1,56	-	>100	-
<i>n</i> -propylamino	>100	1,56/ >25	1,56/ 0,78	100	12,5
<i>n</i> -hexylamino	12,5	12,5	1,56	12,5	-

\*reference na původní vědecký článek <sup>1</sup>

\*\*reference na diplomovou práci <sup>88</sup>

#### 4.5.2 Antifungální aktivita sloučenin

Antifungální aktivita nově připravených sloučenin byla stanovována na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která je součástí Univerzity Karlovy v Praze. Kmeny plísní a hub byly testovány pracovníky Dr. Konečnou K., Dr. Jand'ourkem O. a Dufkovou I. Jsou vyznačeny v Tab. č. 3.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny DMSO a následně naředěny médiem. Testování se provedlo pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách (200  $\mu\text{l}$  media + 10  $\mu\text{l}$  suspenze inokula) při pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165 M), v médiu RPMI 1640 s glutamanem a 2 % roztokem glukosy. Inkubace probíhala staticky, za tmy, v humidní atmosféře po dobu 24–48 hodin při sledované teplotě  $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Hodnota výsledného inokula byla  $0,5\text{--}2 \times 10^5 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Stanovovalo se vizuálně na indikátor AlamarBlue, po odečtení výsledku byla zjištěna výsledná minimální inhibiční koncentrace (MIC) v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Ani jedna z připravených sloučenin ve stanovených koncentracích nevykazovala aktivitu vůči plísním a houbám. Maximální koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byly  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (tato hodnota je relevantní pro OZ-2, OZ-3, OZ-4, OZ9, OZ11, OZ12, OZ13, OZ14 a OZ17), resp.  $125 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  u OZ-5, OZ8-2 a OZ-18 kvůli nižší rozpustnosti. Standartem byl zvolen amfotericin B, který aktivitu vůči kvasinkám a plísním vykazoval (MIC=  $0,06\text{--}1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

**Tab. č.3** testovaných hub a plísní

<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)	
<b>CA1</b> - <i>Candida albicans</i>	ATCC 24433, CCM 8320, lab.ID 166-2016
<b>CK</b> - <i>Candida krusei</i>	ATCC 6258, CCM 8271, lab.ID 169-2016
<b>CP</b> - <i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019, CCM 8260, lab.ID 167-2016
<b>CT</b> - <i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750, CCM 8264, lab.ID 170-2016
<b>AF</b> - <i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 204305, lab.ID 169-2017
<b>AFla</b> - <i>Aspergillus flavus</i>	CCM 8363, lab.ID 174-2017
<b>AC</b> - <i>Absidia corymbifera</i>	CCM 8077, lab.ID 173-2017
<b>TI</b> - <i>Trichophyton interdigitale</i>	ATCC 9533, CCM 8377, lab.ID 172-2017

### 4.5.3 Antibakteriální aktivita sloučenin

Účinnost sloučenin na vybrané bakteriální kmeny byla zkoušena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která je součástí Univerzity Karlovy v Praze. Mikrodiluční bujónovou metodu provedli Dr. Konečná K., Dr. Jand'ourek O. a Dufková I. (Tab. č. 4).

Testované bakterie byly suspendovány v 0,85 % roztoku NaCl, kdy byla připravena suspenze hustoty ekvivalentní 0,5 Mc Farlandovy stupnice ( $1,5 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a následně bylo přidáno médium. Prováděla se mikrodiluční bujónová metoda v destičkách (200 µl media + 10 µl suspenze inokula). Jako médium byl využit Mueller–Hintonův bujon č. 2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulace probíhala 24–48 hodin při 35 ± 2 °C, staticky, za tmy, v humidní atmosféře. Vyhodnocení probíhalo vizuálně na indikátor AlamarBlue.

Ani jedna z testovaných nově připravených sloučenin ve stanovených koncentracích nevykazovala na testované kmeny žádnou antibakteriální aktivitu. Maximální koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byla 500 µmol.l<sup>-1</sup> (u sloučenin OZ-2, OZ-3, OZ-4, OZ-8-2, OZ-9, OZ-11, OZ-12, OZ-13, OZ-14 a OZ-17), resp. 125 µmol.l<sup>-1</sup> u OZ-5 a OZ-18 kvůli nižší rozpustnosti. Standardem byl zvolen ciprofloxacin, který požadovanou antimykobakteriální aktivitu vykazoval (MIC= 0,004–0,25 µmol.l<sup>-1</sup>).

**Tab. č. 4** testovaných kmenů vybraných bakterií

<b>Testované kmeny</b> (kód, číslo)	
<b>SA</b> <i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>	ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016
<b>MRSA</b> <i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>	ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016
<b>SE</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	klinický izolát, lab.ID 112-2016
<b>EF</b> <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016
<b>EC</b> <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016
<b>KP</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinický izolát, lab.ID 64-2016
<b>SEMA</b> <i>Serratia marcescens</i>	klinický izolát, lab.ID 62-2016
<b>PA</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016

## 5 Diskuze

Nově nasyntetizované látky byly připraveny z 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny, která reaguje s  $\text{SOCl}_2$  (thionyl chloridem) za vzniku chloridu kyseliny, poté následuje nukleofilní substituce *p*-aminobenzoové kyseliny, aby vznikl námi požadovaný karboxamid. Dalším krokem byla nukleofilní substituce amoniakem nebo (alkyl)aminem na halogenovaný pyrazinový kruh při 120 °C v prostředí DMSO v mikrovlnném reaktoru (případně 10 h pod zpětným chladičem při 140 °C).

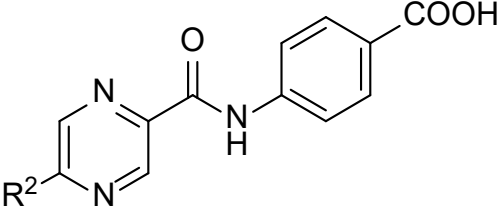
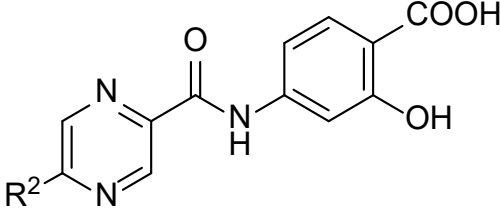
Praktické výtěžky (chromatograficky čistého produktu po všech čistících operacích) se pohybovaly od 12 % do 81 % teoretického výtěžku. Průměrný teoretický výtěžek je přibližně 49,5 %. Ztráty byly zpravidla zapříčiněny čistícími operacemi, kterými byly chromatografické čištění, adsorpce na silikagel, adsorpce na aktivní uhlí při rekrystalizaci z horkého DMSO.

Stanovili jsme  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, IČ spektra a elementární analýzu, abychom byli schopni prokázat vyžadované struktury nově nasyntetizovaných sloučenin. Pomocí bodotávku jsme pak naměřili další charakteristickou vlastnost, kterou je teplota tání (*t<sub>m</sub>*). Naše sloučeniny jsou bílé, případně nažloutlé prášky pevného skupenství bez charakteristického zápachu.

Log *P* a CLog*P* byly vypočteny pomocí programu ChemDraw Professional 17.0. Jedná se o hodnoty charakterizující lipofilitu. Hodnota log *P* se pohybovala od -0,99 do 2,92. a Clog*P* byly od -0,5202 do 4,98846

Na základě dříve potvrzené aktivity derivátů 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů s delším alkylovým řetězcem na pyrazinovém jádře jsme chtěli ověřit, zda je opravdu aktivita sloučenin s propylovým či hexylovým řetězcem vyšší než u aminoderivátu, případně nesubstituovaných derivátů v poloze 5 pyrazinového kruhu <sup>2</sup>. Dříve připravená kyselina 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová vykazovala selektivní aktivitu proti *M.tbc* H37Rv, MIC u *M.tbc* H37Rv byla 3,13  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  <sup>1</sup>. Vyhodnocení antimykobakteriální aktivity (*M. tbc* H37Rv) u derivátů 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a u derivátu 2-hydroxy-4-(5- (alkyl)amino pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny najdete v Tab.č. 5.

**Tab.č.5 :** Antimykobakteriální aktivita (*M. tbc* H37Rv) u 5-amino a 5-alkylamino derivátů na pyrazinovém cyklu u derivátů 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a u derivátů 2-hydroxy-4-(5-(alkyl)amino pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny vyjádřena jako MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )

Deriváty 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido) benzoové kys.			Deriváty 2-hydroxy-4-(5-(alkyl)amino pyrazin-2-karboxamido)benzoové kys.		
					
kód	R <sup>2</sup>	MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	kód	R <sup>2</sup>	MIC ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
OZ-15	5-Cl	>50	30*	5-Cl	3,13
OZ-16	5-NH <sub>2</sub>	>50	-	-	-
OZ-17	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	>100	OZ-2	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	1,56/ <b>0,78</b>
OZ-18	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	12,5	OZ-5	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	1,56
INH		0,2 – 0,39	INH		0,2 – 0,39

\*reference <sup>1</sup>

Z našich tabulek (Tabulky č.1, č.2 a č.5) můžeme usoudit, že delší postranní řetězec (C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>) pozitivně ovlivňuje účinnost sloučenin na *M. tbc* H37Rv. S delším alkylaminovým řetězcem na pyrazinovém jádře v poloze 5 má sloučenina vyšší lipofilitu, což by mohlo značit lepší přechod sloučenin přes lipofilní membránu, kterou je v tomto případě buněčná stěna mykobakterie.

Dalším naším cílem bylo zjistit, jak bude ovlivněna aktivita u sloučenin s různě substituovanou benzoovou kyselinou v poloze 2 (R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>, OH, Cl) (Tab.č.6). Při porovnávání jednotlivých hodnot MIC můžeme zaznamenat, že u derivátů na benzenovém jádře kyseliny benzoové substituovaných OH-skupinou je aktivita na kmenech mykobakterií vyšší než u derivátů s ostatními substituenty. Poměrně nižší antimykobakteriální aktivitu pak vykazovaly látky substituované v poloze 2 halogenem, následované methylem. Odstraněním funkční skupiny v poloze 2 (R<sup>1</sup> = H) se aktivita proti mykobakteriím velmi snížila.

**Tab.č.6** Antimykobakteriální aktivita u sloučenin s různě substituovanou benzoovou kyselinou v poloze 2 v MIC ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

	R <sup>2</sup>	R <sup>1</sup>	<i>M. smeg.</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. tbc</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. kans.</i>
OZ15	5-Cl	H	$\geq 250$	125	>50	>50	>50
OZ16	5-NH <sub>2</sub>	H	n.a.	n.a.	>50	>50	>50
OZ17	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	H	$\geq 500$	250	>100	>100	>100
OZ18	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	H	$\geq 500$	$\geq 500$	12,5	>100	>100
OZ11	5-NH <sub>2</sub>	Cl	$\geq 500$	$\geq 500$	12,5	>100	>100
OZ3	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	Cl	$\geq 500$	250	1,56/ <b>0,78</b>	>100/ <b>&gt;25</b>	>100/ <b>&gt;25</b>
OZ4	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Cl	250	250	12,5	100	>100
OZ12	5-NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	$\geq 500$	$\geq 500$	>100	>100	>100
OZ13	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	CH <sub>3</sub>	$\geq 500$	$\geq 500$	100	>100	>100
OZ14	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	CH <sub>3</sub>	62,5	62,5	12,5	>100	25
OZ9	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	OCH <sub>3</sub>	$\geq 500$	$\geq 500$	12,5	>100	>100
30*	5-Cl	OH	n.t.	n.t.	3,13	>100	n.t.
OZ2	5-NH- <i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	OH	250	$\geq 500$	1,56/ <b>&gt;25</b>	100/ <b>&gt;25</b>	>100/ <b>&gt;25</b>
OZ5	5-NH- <i>n</i> -C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	OH	125	125	1,56	>100	100
INH			7,81–15,625	3,91	0,2 – 0,39	6,25–12,5	6,25–25
CPX			$6,25 \times 10^{-3}$ – $125 \times 10^{-3}$	$7,81 \times 10^{-3}$ – $156,3 \times 10^{-3}$			
RFM			6,25–25	1,56			

Látky s delším postranním řetězcem (C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>) a substituované hydroxy-, případně methyl skupinou v poloze 2 benzenového jádra (OZ-2 a OZ-14) měly nejširší spektrum účinku na různé druhy mykobakterií. Při testování na *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv byla u sedmi nových látek (OZ-18, OZ-11, OZ-4, OZ-14, OZ-9, OZ-2, OZ-5) změřena MIC v rozmezí hodnot MIC = 0,78–12,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Antimykobakteriální aktivita se u látek JZ-OZ-2 a JZ-OZ-3 zjišťovala dvakrát (podruhé v ředění 25–0,39  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Zatímco nově připravená látka JZ-OZ-2 vykazovala v opakovaném testu dokonce vyšší aktivitu proti *M. tbc* (MIC= 0,78  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), u JZ-OZ-3 se aktivita nepotvrdila (MIC  $\geq 25$   $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Příčina zjištěného rozdílu není známa.

Sloučenina JZ-OZ-8-1 byla v literatuře již v minulosti popsána (CAS 1591954-17-4), nebyla ovšem publikována její antimykobakteriální aktivita. Dle našich měření má tato sloučenina (jedná se o cyklický lakton kyseliny 4-aminosalicylové) antimykobakteriální aktivitu proti *M. tbc* o MIC = 1,56  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Tato hodnota naznačuje, že strategie maskování hydrofilní povahy 4-aminosalicylové kyseliny vytvořením cyklického laktonu by mohla být účinná při vytváření nových potenciálních antituberkulotik. Lakton 4-aminosalicylové kyseliny (JZ-OZ-8-1) se poté stal výchozí látkou pro karboxamid JZ-OZ-8-2. Výchozí látka 30<sup>1</sup> (podle mého označení se nazývá JZ-OZ-1) 2-hydroxy-4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)benzoová, kdy se jedná v podstatě o derivát substituované nezacyklené 4-aminosalicylové kyseliny, pak vykazovala selektivní aktivitu proti *M. tbc* (MIC = 3,13  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Interpretovaná spektra NMR a IČ ukazují na předpokládanou

strukturu, avšak neuspokojivé výsledky elementární analýzy nedovolují prohlásit tuto strukturu za potvrzenou. Sloučenina bude v budoucnu opět syntetizována a přetestována.

## 6 Závěr

V teoretické části jsem se zabýval obecnou charakteristikou tuberkulózy, a zvláště jsem se zaměřil na moderní poznatky pocházející ze světa i z území ČR. Nesmím zapomenout zmínit, že v teoretické části jsem kladl důraz i na zatím známé možnosti léčby, potenciální cesty výzkumu, a hlavně jsem se zabýval problémem v dnešní době toliko skloňovaným – výskytem rezistence a jak ji v konečném důsledku řešit.

V experimentální části jsem se zaměřil na postup přípravy všech 14 nových, v literatuře dosud nepopsaných substituovaných derivátů 4-(5-(alkyl)aminopyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny. Kontrola dle CAS SciFinder proběhla dne 11. 04. 2018. Struktura čistých získaných sloučenin byla potvrzena pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR a IČ spekter. Změřil jsem teploty tání a na katedře KFCHFA byla provedena elementární analýza. V programu ChemBioDraw jsem vytvořil chemické vzorce. Následně pak byly vypočteny parametry jako  $\log P$ ,  $\text{CLogP}$  a hodnoty teoretické elementární analýzy.

U nově připravených látek byla testována biologická účinnost na různé druhy mykobakterií, bakterie a houby. Antifungální a antibakteriální aktivita u testovaných látek v testovaných koncentracích nebyla prokázána, s výhodou tedy můžeme pozorovat selektivní antimykobakteriální aktivitu. Nejvyšší aktivita proti *M. tbc* H37Rv byla zaznamenána u JZ-OZ-2 ( $0,78 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), JZ-OZ-5 ( $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), JZ-OZ-8-2 ( $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Vzhledem k neuspokojivým výsledkům elementární analýzy je nutno biologické výsledky pro JZ-OZ-5 a JZ-OZ-8-2 považovat za předběžné, proto je před dalším testováním nutné tyto látky znovu přechistit. Dle zvolené metody čištění (rekrytalizace z DMSO) je možné, že vzorky jsou znečištěny zbytky DMSO – tomu by odpovídal fakt, že NMR spektra se jevila (až na zvýrazněné signály rozpouštědla DMSO) jako čistá. Další možností, která dle způsobu zpracování reakce (okyselení HCl) připadá do úvahy, je fakt, že část produktu mohla být izolována jako hydrochlorid. Sloučeniny mohou být také znečištěny zbytkem reagentů – aminů. U problémových látek JZ-OZ-5 a JZ-OZ-8-2 bude změřeno MS spektrum pro ověření molekulové hmotnosti (ověření předpokládané struktury).

Dále zmiňované produkty vykazovaly aktivitu i na jiné druhy mykobakterií. Látky JZ-OZ-14 a JZ-OZ-8-2 byly aktivní proti *M. kansasii* My 235/80,  $\text{MIC} = 25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Po vyhodnocení všech testovaných sloučenin jsem dospěl k závěru, že obměnou strukturní části tvořící PAS, kdy se jedná o odstranění nebo náhradu – OH skupiny v poloze 2, se antimykobakteriální aktivita snižuje. Maskováním funkčních skupin – COOH a – OH tvorbou vnitřních esterů se aktivita nemění, resp. nesnižuje (JZ-OZ-8-2). Samotný prekurzor látky JZ-OZ-8-2, kterým je 7-amino-4a,8a-dihydro-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-4-on (JZ-OZ-8-1), pak vykazuje antimykobakteriální aktivitu proti *M. tbc* ( $\text{MIC} = 1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a *M. kansasii* ( $\text{MIC} = 6,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), což může být jeden z důvodů, že i nově připravená látka JZ-OZ-8-2 vykazovala antimykobakteriální aktivitu.

Můžeme potvrdit i náš předpoklad o delším postranním řetězci, tj. čím je alkylaminový řetězec na pyrazinovém cyklu delší, tím má sloučenina vyšší lipofilitu, která by mohla ovlivňovat přechod těchto látek přes lipofilní fosfolipidovou dvojvrstvu a dlouhé mykolové kyseliny buněčné stěny mykobakterií. Sloučeniny s delším alkylaminovým řetězcem C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> ve většině případů vykazovaly vyšší aktivitu proti mykobakteriím oproti výchozím látkám, které byly nasubstituovány v poloze 5 pyrazinového jádra příslušným halogenem (chlorem).

## 7 Abstrakt

### SLOUČENINY KOMBINUJÍCÍ FRAGMENT PYRAZINAMIDU A P-AMINOSALICYLOVÉ KYSELINY JAKO POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA II

ŽÁK ONDŘEJ

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Karlova univerzita, Česká republika

Byla připravena série nových sloučenin kombinujících pyrazinamid a kyselinu *p*-aminobenzoovou a testována *in vitro* na antimykobakteriální účinnost proti *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. aurum* a *M. smegmatis*. Dříve připravená kyselina 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová (R<sup>1</sup> = OH) vykazovala antimykobakteriální aktivitu proti *M. tbc* a *in vitro* nízkou cytotoxicitu na HepG2 buňkách.

*Para*-aminosalicylová kyselina (PAS) má významné antituberkulotické vlastnosti založené na její podobnosti s kyselinou *p*-aminobenzoovou, čímž interferuje s metabolismem folátů v mykobakteriích. Abychom posoudili důležitost úlohy fragmentu PAS, navrhli jsme a připravili deriváty se substitucí na fenylovém kruhu (R<sup>1</sup>). Další modifikací struktury byla náhrada 5-Cl na pyrazinovém jádru za (alkyl)aminosubstituent (JZ-OZ), který byl úspěšnou modifikací v předchozích sériích. Konečné sloučeniny byly jednoznačně popsány pomocí bodu tání, elementární analýzou, IR spektroskopii a <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR spektry.

Obměnou fragmentu PAS, kdy jsme odebrali nebo nahradili skupinu OH v poloze 2 benzenového kruhu, se snížila antimykobakteriální aktivita. Maskováním funkčních skupin -COOH a -OH (připravili jsme vnitřní ester), se antimykobakteriální aktivita nezměnila. Čím delší je alkylaminový řetězec na jádře pyrazinu, tím vyšší je lipofilita sloučeniny, což by mohlo ovlivnit průnik buněčnou stěnou.

Nová sloučenina 2-hydroxy-4-(5-(propylamino)pyrazin-2-karboxamido)benzoová (JZ-OZ-2) prokázala nejvyšší antimykobakteriální (mikromolární) účinnost proti *M.tuberculosis* (MIC = 0,78 μg.ml<sup>-1</sup>).

Důležitost fragmentu PAS a výhoda delšího alkylaminového řetězce byly potvrzeny. Vztahy mezi strukturou a aktivitou byly diskutovány.

## 8 Abstract

### COMPOUNDS COMBINING PYRAZINAMIDE AND *P*-AMINOSALICYLIC ACID FRAGMENTS AS POTENTIAL ANTITUBERCULARS II

ŽÁK ONDŘEJ

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Czech Republic

A series of new compounds combining pyrazinamide and *p*-aminobenzoic acid was prepared and *in vitro* tested for antimycobacterial activity against *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. aurum* and *M. smegmatis*. Previously prepared 4-(5-chloropyrazine-2-carboxamido)-2-hydroxybenzoic acid ( $R^1 = OH$ ) exerted micromolar activity against *M. tuberculosis* and low *in vitro* cytotoxicity in HepG2 cells.

*Para*-Aminosalicylic acid (PAS) has significant antitubercular properties based on its resemblance to *p*-aminobenzoic acid and interference with the folate pathway in mycobacteria. To assess the role of the PAS fragment, we designed and prepared derivatives with modified substitution on the phenyl ring ( $R^1$ ). Further modification was the exchange of 5-Cl on the pyrazine core for (alkyl)amino substituent (**JZ-OZ**), which was a successful modification in previous series. Final compounds were described by melting point, elementary analysis, IR spectroscopy and  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR.

Changing the PAS fragment, when we removed or replaced the OH-group at position 2, the antimycobacterial activity decreased. By masking the functional groups - COOH and - OH (we prepared internal cyclic ester), the antimycobacterial activity did not reduce. The longer the alkylamino chain on the pyrazine core, the higher lipophilicity of the compound. This could affect the penetration through the cell membrane.

New compound 2-hydroxy-4-(5-(propylamino)pyrazine-2-carboxamido)benzoic acid (**JZ-OZ-2**) proved the best (micromolar) activity against *M. tuberculosis* (MIC= 0,78  $\mu g.ml^{-1}$ ).

The importance of the PAS fragment and the advantage of the longer alkylamino chain were confirmed. Structure-activity relationships were discussed.



## 9 Seznam použité literatury

---

- <sup>1</sup> ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ, P. PATEROVÁ, et al. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, **2013**, *18*,14807-25.
- <sup>2</sup> ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ, A. JANOUTOVÁ, et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, *21* ,174-183.
- <sup>3</sup> VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
- <sup>4</sup> Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017 převzato z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259366/1/9789241565516-eng.pdf?ua=1>
- <sup>5</sup> BELL, L. C. K., M. NOURSADEGHI. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nature Reviews Microbiology*, **2017**, *16*, 80-90.
- <sup>6</sup> ROTHSCHILD, B. M., L. D. MARTIN, G. LEV, et al. Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clinical Infectious Diseases*, **2001**, *33*, 305-311.
- <sup>7</sup> HERSHKOVITZ, I., H. D. DONOGHUE, David E. MINNIKIN, et al. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*, **2008**, *3*, e3426 .
- <sup>8</sup> SKLENAR, V., I. PÁLKOVÁ, Z. HLOBIL. *Aktuální otázky pneumologie a fizeologie a péče o nemocné na odděleních TRN*. Vyd. 2. přeprac. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-7013-217-5.
- <sup>9</sup> CAMBAU, E., M. DRANCOURT. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*, **2014**, *20*, 196-201.
- <sup>10</sup> YABLONSKII, P. K., B. I. VISHNEVSKIY, N. S. SOLOVYEVA, et al. Drug resistance of mycobacterium tuberculosis in different localizations of the disease. *Russian Journal of Infection and Immunity*, **2016**, *6*, 133-140.
- <sup>11</sup> KURUP, R., K. CHESTER. Comparative Evaluation of Ziehl Neelsen Staining and KAP of Laboratory Personnel in Relation to Ziehl Nielsen. *West Indian Medical Journal*, **2014**, *63*, 34-39.
- <sup>12</sup> HRUŠKA, K., M. KAEVSKA. Mycobacteria in water, soil, plants and air: a review. *Veterinární Medicína*, **2012**, *57*, 623-679.
- <sup>13</sup> MESQUITA, E. D. D., L. GIL-SANTANA, D. RAMALHO, et al. Associations between systemic inflammation, mycobacterial loads in sputum and radiological improvement after treatment initiation in pulmonary TB patients from Brazil: a prospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, **2016**, *16*, 368-368.
- <sup>14</sup> ÖZTÜRK, Cihadiye Elif, İdris ŞAHİN, Şükrü ÖKSÜZ, et al. Investigation of Mycobacterium bovis subsp. bovis Among the Strains of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolated in Düzce Province, Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*, **2016**, *50*, 392-400.
- <sup>15</sup> LUCA, S., T. MIHAESCU. History of BCG Vaccine. *Mædica*, **2013**, *8*, 53-58.
- <sup>16</sup> Global leprosy strategy 2016–2020: accelerating towards a leprosy-free world. New Delhi, World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2016. Převzato z: <http://www.wpro.who.int/leprosy/documents/globalleprosystrategy2016-2020.pdf>, accessed August 2017
- <sup>17</sup> ADDISON, N. O., S. PFAU, E. KOKA, et al. Assessing and managing wounds of Buruli ulcer patients at the primary and secondary health care levels in Ghana. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **2017**, *11*, e0005331

- 
- <sup>18</sup> Přednáška, Tuberkulóza a její léčba, Přemysl Mladěnka, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016
- <sup>19</sup> HOMOLKA, J. *Tuberkulóza*. 5., upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3476-0.
- <sup>20</sup> WU, B., Y. YU, W. XIE, et al. Epidemiology of tuberculosis in Chongqing, China: a secular trend from 1992 to 2015. *Scientific Reports*, **2017**, 7, 7832.
- <sup>21</sup> VAŠAKOVÁ, M. Tuberculosis in the Czech Republic. Current status. Diagnosis, treatment and prevention. *Vnitřní lékařství*, **2013**, 59, 284-9.
- <sup>22</sup> Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR; převzato z <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/tuberkuloza-respiracni-nemoci>
- <sup>23</sup> DOLEŽALOVÁ, K., K. KŘEPELA, H. HOUŠŤKOVÁ. Výskyt tuberkulózy a mykobakterií v České republice u dětí v letech 2000-2015: Incidence of tuberculosis at children in the Czech Republic in years 2000-2015. *Czechoslovak Pediatrics / Cesko-Slovenska Pediatrie*. **2016**, 71, 324-329
- <sup>24</sup> Vакciny.net, Očkování proti tuberkulóze, převzato z: [http://www.vakciny.net/doporucene\\_ockovani/TBC.htm#chapter4](http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/TBC.htm#chapter4) [citace 1.2.2018]
- <sup>25</sup> Ministerstvo zdravotnictví ČR, Vyhláška č. 299/2010, převzato z: [https://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-\\_2464\\_5.html](https://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-_2464_5.html) [citace 1.2.2018]
- <sup>26</sup> Ministerstvo zdravotnictví ČR, Vyhláška č. 306/2012 Sb., převzato z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-306>
- <sup>27</sup> PTÁKOVÁ, M., J. KLAMO, J. DVOŘÁČEK. Problematika diagnostiky urogenitální tuberkulózy ve vztahu k legislativě. *Urologie pro praxi*, **2003**, 4, 66–68
- <sup>28</sup> AUTORŮ K., *Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí*. Praha: Státní zdravotní ústav – Národní referenční laboratoř pro mykobakterie, 1998. ISBN 9788070711095..
- <sup>29</sup> PTÁKOVÁ, M. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií. *Solen*, **2011**, 8, 466-8
- <sup>30</sup> CRUMP, J. A., A. B. MORRISSEY, H. O. RAMADHANI, et al. Controlled Comparison of BacT/Alert MB System, Manual Myco/F Lytic Procedure, and Isolator 10 System for Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, **2011**, 49, 3054-3057
- <sup>31</sup> CHO, S.N. Current Issues on Molecular and Immunological Diagnosis of Tuberculosis. *Yonsei. Medical Journal*, **2007**, 48, 347–359
- <sup>32</sup> AMLEROVÁ, J., J. HRABÁK. IGRA methods in the routine operation - QuantiFERON®-TB Gold or T-SPOT.TB. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie: casopis Spolecnosti pro epidemiologii a mikrobiologii Ceske lecarske spolecnosti J.E. Purkyne*, **2017**, 65, 246-248.
- <sup>33</sup> PETRUCCIOLI, E., T. CHIACCHIO, I. PEPPONI, et al. Characterization of the CD4 and CD8 T-cell response in the QuantiFERON-TB Gold Plus kit. *International Journal of Mycobacteriology*, **2016**, 5, S25-S26.
- <sup>34</sup> BÁRTU, V. Tuberkulóza–infekční choroba v 21. století. *Medicina pro praxi*, **2008**, 5, 245-248.
- <sup>35</sup> PARIDA, S. K., R. AXELSSON-ROBERTSON, M. V. RAO, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *Journal of Internal Medicine*, **2015**, 277, 388-405

- 
- <sup>36</sup> ANDERSSON, D. I., D. HUGHES. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*, **2010**, *8*, 260-271
- <sup>37</sup> PHILLIPS, P.C. Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet*. **2008**, *9*, 855–867.
- <sup>38</sup> SINGH, P., R. N. RAO, J. R. CH. REDDY, et al. PE11, a PE/PPE family protein of Mycobacterium tuberculosis is involved in cell wall remodeling and virulence. *Scientific Reports*, **2016**, *6*, 21624.
- <sup>39</sup> LI, G., J. ZHANG, Q. GUO, et al. Efflux Pump Gene Expression in Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *PLOS ONE*, **2015**, *10*, e0119013.
- <sup>40</sup> BURIANKOVA, K., F. DOUCET-POPULAIRE, O. DORSON et al. Molecular Basis of Intrinsic Macrolide Resistance in the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2004**, *48*, 143-150.
- <sup>41</sup> HOUGHTON, J. L., K. D. GREEN, R. E. PRICER, et al. Unexpected N-acetylation of capreomycin by mycobacterial Eis enzymes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2013**, *68*, 800-805.
- <sup>42</sup> HEGDE, S. S. A Fluoroquinolone Resistance Protein from Mycobacterium tuberculosis That Mimics DNA. *Science*, **2005**, *308*, 1480-1483.
- <sup>43</sup> LIAQAT, A., M. A. IQBAL, M. A. REHMAN KHADAM. Tuberculosis; knowledge, attitude and practice towards tuberculosis treatment: dots (directly observed treatment short course) by medical officers. *The professional medical journal*, **2017**, *24*, 1044-1048.
- <sup>44</sup> BLACK, P. A., R. M. WARREN, G. E. LOUW et al. Energy Metabolism and Drug Efflux in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2014**, *58*, 2491-2503.
- <sup>45</sup> WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis - 2016 Update, Geneva: World Health Organization; 2016, převzato z: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250125/1/9789241549639-eng.pdf?ua=1> [citace 08.02.2017]
- <sup>46</sup> KOS S. Tuberkulóza dýchacího ústrojí. *Postgraduální medicína*, **2006**; *8*, 639–642.
- <sup>47</sup> ARBEX, M. A., M. D. L. VARELLA, H. R. de SIQUEIRA, et al. Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, **2010**, *36*, 626-640.
- <sup>48</sup> Přednáška, Eliminace léčiv, František Štaud, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016
- <sup>49</sup> TAI, WP., H. YUE a PJ. HU. Coma caused by isoniazid poisoning in a patient treated with pyridoxine and hemodialysis. *Advances in Therapy*, **2008**, *25*, 1085-1088.
- <sup>50</sup> CAMINERO LUNA, JA. *Tuberculosis guide for specialist physicians*. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2004. ISBN 2914365136.
- <sup>51</sup> SAXENA, A., R. KUMARI, U. MUKHERJEE, P. SINGH a R. LAL. Draft Genome Sequence of the Rifamycin Producer *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Genome Announcements*, **2014**, *2*, e00662-14.
- <sup>52</sup> ENGELHARD, D., H. R. STUTMAN, M. I. MARKS. Interaction of Ketoconazole with Rifampin and Isoniazid. *New England Journal of Medicine*, **1984**, *311*, 1681-1683.
- <sup>53</sup> ZHANG, Y., D. MITCHISON, W. SHI, et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, **2014**, *2*, 1-12.
- <sup>54</sup> DILLON, N. A., N. D. PETERSON, H. A. FEAGA, et al. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Scientific Reports*, **2017**, *7*, 6135.

- 
- <sup>55</sup> GOPAL, P., W. NARTEY, P. RAGUNATHAN, et al. Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infectious Diseases*, **2017**, 3, 807-819.”
- <sup>56</sup> SAYAHI, H., O. ZIMHONY, W. R. JACOBS, A. SHEKHTMAN, et al. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21, 4804-4807
- <sup>57</sup> KIM, H., K. SHIBAYAMA, E. RIMBARA, S. MORI, et al. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLoS ONE*, **2014**, 9, e100062
- <sup>58</sup> ZHANG, Y., W-W. YEW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: update 2015. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2015**, 19, 1276-1289
- <sup>59</sup> ALL-TIME GREATEST INNOVATORS., *Warren Group*, **2014**, 14-17.
- <sup>60</sup> HEIFETS, L., P. LINDHOLM-LEVY. Comparison of bactericidal activities of streptomycin, amikacin, kanamycin, and capreomycin against Mycobacterium avium and M. tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1989**, 33, 1298-301.
- <sup>61</sup> DI PERRI, G., S. BONORA Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**, 54, 593-602.
- <sup>62</sup> ALLEN, B.W., D.A. MITCHISON, Y.C. CHAN, et al. Amikacin in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Tubercle*, **1983**, 64, 111-118.
- <sup>63</sup> MCCLATCHY, J. K., W. Kanes, P. T. Davidson, et al. Cross-resistance in M. tuberculosis to kanamycin, capreomycin, and viomycin. *Tubercle*, **1977**, 58, 29-34.
- <sup>64</sup> FEREBEE, S. H., B. E. DOSTER, F. J. MURRAY. Ethambutol: a substitute for para-aminosalicylic acid in regimens for pulmonary tuberculosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1966**, 135, 910-920
- <sup>65</sup> MINATO, Y., J. M. THIEDE, S. L. KORDUS, et al. Mycobacterium tuberculosis Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for para -Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2015**, 59, 5097-5106.
- <sup>66</sup> ARBEX, M. A., M. D. L. VARELLA, H. R. de SIQUEIRA, et al., Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia: Publicacao Oficial Da Sociedade Brasileira De Pneumologia E Tisiologia*, **2010**. 36, 641-656.
- <sup>67</sup> DONALD, P. R., A. H. DIACON. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *The Lancet Infectious Diseases*, **2015**, 15, 1091-1099.
- <sup>68</sup> STOREY, P. B. A comparison of isoniazid-cycloserine with isoniazid-PAS in the therapy of cavitary pulmonary tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, **1960**, 81, 868-79.
- <sup>69</sup> GINSBURG, A. S., J. H. GROSSET, W. R. BISHAI. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **2003**, 3, 432-442.
- <sup>70</sup> Přednáška, Antibiotika ovlivňující funkci a syntézu nukleových kyselin, Jakub Hofman, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016
- <sup>71</sup> CAMINERO, J. A., G. SOTGIU, A. ZUMLA, et al. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, **2010**, 10, 621-629.
- <sup>72</sup> ALAHARI, A., X. TRIVELLI, Y. GUÉRARDEL, et al. Thiacetazone, an Antitubercular Drug that Inhibits Cyclopropanation of Cell Wall Mycolic Acids in Mycobacteria. *PLoS ONE*, **2007**, 2, e1343

- 
- <sup>73</sup> DRUG BANK – Ethionamid, převzato z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00609> [citace 13.2.2018]
- <sup>74</sup> COYNE, K. M., A. L. POZNIAK, M. LAMORDE, et al. Pharmacology of second-line antituberculosis drugs and potential for interactions with antiretroviral agents. *AIDS*, **2009**, *23*, 437-446
- <sup>75</sup> Přednáška, Antibiotika ovlivňující bakteriální buněčnou stěnu nebo membránu, Jakub Hofman, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016
- <sup>76</sup> CHOLO, M. C., M. T. MOTHIBA, B. FOURIE, et al. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2017**, *72*, 338-353
- <sup>77</sup> TANG, S., L. YAO, X. HAO, et al. Efficacy, safety and tolerability of linezolid for the treatment of XDR-TB: a study in China. *European Respiratory Journal*, **2014**, *45*, 161-170
- <sup>78</sup> GUALANO, G., S. CAPONE, A. MATTEELLI, et al. New antituberculosis drugs: from clinical trial to programmatic use. *Infectious Disease Reports*, **2016**, *8*, 43-49.
- <sup>79</sup> ANDREWS, J. To be or not to be exclusive: the sutezolid story. *The Lancet Global Health*, **2016**, *4*, e89-e90.
- <sup>80</sup> HARTL, J., K. PALÁT. Farmaceutická chemie I. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 9788024620336.
- <sup>81</sup> CHOI, P. J., H. S. SUTHERLAND, A. S. T. TONG, et al. Synthesis and evaluation of analogues of the tuberculosis drug bedaquiline containing heterocyclic B-ring units. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27*, 5190-5196.
- <sup>82</sup> SÚKL- Sirturo, převzato z: [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002614/WC500163209.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002614/WC500163209.pdf) [citace 13.03.2018]
- <sup>83</sup> BALASUBRAMANIAN, V., S. SOLAPURE, H. IYER, et al. Bactericidal Activity and Mechanism of Action of AZD5847, a Novel Oxazolidinone for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2013**, *58*, 495-502.
- <sup>84</sup> SÚKL- Delytba, převzato z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0194927> [citace 16.2.2018]
- <sup>85</sup> LIN, F., Q. SONG, Y. GAO, X. CUI. A catalyst-free, facile and efficient approach to cyclic esters: synthesis of 4H-benzo[d][1,3]dioxin-4-ones. *RSC Advances*, **2014**, *4*, 19856-19860.
- <sup>86</sup> HENDERSON, A. J., M. HADDEN, C. GUO, et al. 2,3-Diaminopyrazines as rho kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. **2010**, *20*, 1137-1140.
- <sup>87</sup> IONG, L., YQ. GAO, CE. NIU, HB. WANG a WH LI. Synthesis and In Vitro Anticancer Activity of Novel 2-((3-thioureido)carbonyl) phenyl Acetate Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, **2013**, *11*, 132-137.
- <sup>88</sup> Diplomová práce, Zlúčeniny kombinujúce fragment pyrazínamidu a 4-aminobenzoovej kyseliny ako potencionalne antituberkulotiká, Jana Žecová, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018