

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**Zlúčeniny kombinujúce fragment pyrazínamidu
a 4-aminobenzoovej kyseliny ako potencionálne
antituberkulotiká**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce

PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Jana Žecová

PodĎakovanie

Veľmi rada by som poĎakovala vedúcemu mojej diplomovej práce PharmDr. Jánovi Zitkovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, pomoc a veľkú trepezlivosť pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Ďalšie veľké poĎakovanie patrí mojej rodine a priateľovi za podporu a pevné nervy. V neposlednom rade sa chcem poĎakovať všetkým, ktorí sa podieľali na biologickom testovaní nových látok.

Táto práca bola podporená Grantovou agentúrou Českej republiky (projekt č. 17-27514Y) a Ministerstvom školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky (SVV 260 401).

„ Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z nich som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

.....

Jana Žecová

V Hradci Králové 14.05.2018

Obsah

1. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	6
2. CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ	10
3.1. Tuberkulóza	10
3.2. Epidemiológia	10
3.3. Pôvodca – <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	11
3.4. Patogenita a rizikové faktory	11
3.5. Diagnostika a klinické príznaky.....	12
3.6. Prevencia ochorenia	14
3.7. Farmakoterapia.....	14
3.7.1. Liečivá 1. línie	15
3.7.2. Liečivá 2. línie	20
3.7.3. Liečivá nové a naďalej vyvíjané	28
3.7.1. Štruktúrne modifikácie pyrazínamidových derivátov a ich vzťah štruktúra -účinok.....	32
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	39
4.1. Použité chemikálie, prístroje a analytické metódy	39
4.2. Metódy syntéz.....	41
4.3. Predvolené látky	46
4.4. Novo pripravené látky – finálne produkty.....	48

4.5.	Výsledky biologického hodnotenia.....	61
4.5.1.	Antibakteriálna aktivita.....	61
4.5.2.	Antifungálna aktivita.....	62
4.5.3.	Antimykobakteriálna aktivita.....	63
4.5.4.	<i>In vitro</i> cytotoxicita na HepG2 bunečnej línii.....	66
5.	DISKUSIA.....	68
6.	ZÁVER.....	71
7.	ABSTRAKT	73
8.	ABSTRACT	75
9.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	77

1. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5-Cl-POA – 5-chlórpyrazín-2-karboxylová kyselina

AIDS – syndróm získaného zlyhania imunity (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

AT – antituberkulotiká

ATB – antibiotiká

ATP – adenosintrifosfát

BCG – Bacille Calmette-Guérin

CPX – ciprofloxacín

ČR – Česká republika

DHFR – dihydrofolát reduktáza

DHFS – dihydrofolát syntáza

DHPPP – 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterín pyrofosfát

DHPS – dihydropteroát syntáza

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*Deoxyribonucleid Acid*)

dTMP – deoxythymidín monofosfát

dUMP – deoxyuridín monofosfát

ETH - ethionamid

FAD – flavínadenín dinukleotid

FAF UK – Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy

FAS II – syntáza mastných kyselín (*Fatty Acid Synthase*)

FDA – Food and Drug Organisation

GR - granulóm

H₂Pte - dihydropteroát

H₂PteGlu - dihydrofolát

H₄PteGlu – tetrahydrofolát

HIV – vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (Human Immunodeficiency Virus)

HPOA – protonizovaná pyrazín-2-karboxylová kyselina

Hydroxy-H₂Pte – hydroxy-dihydropteroát

Hydroxy-H₂PteGlu – hydroxy-dihydrofolát

INH – isoniazid

INH-NADH – isoniazid-nikotínamidadenín dinukleotid

IR – infračervené spektrum

KBLV – Katedra biologických a lekárskeho vied

KOBCH – Katedra organickej a bioorganickej chémie

log *P* – rozdeľovací koeficient v sústave *n*-oktanol/voda

M. - *Mycobacterium*

MDR – mnohočetná lieková rezistencia (*Multidrug-Resistant*)

MIC – minimálna inhibičná koncentrácia

M. tbc – *Mycobacterium tuberculosis*

NAD⁺ - nikotínamidadenín dinukleotid

NADH – redukovaná forma nikotínamidadenín dinukleotidu

NMR – nukleárna molekulová rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)

PABA – kyselina *p*-aminobenzoová

PAS – kyselina *p*-aminosalicylová

POA – kyselina pyrazín-2-karboxylová

PZA – pyrazínamid

QA – chinolinová kyselina

QAPRTáza – fosforibosyltransferáza chinolinovej kyseliny

RibD – riboflavin biosynthesis protein

RIF – rifampicín

RNA – ribonukleová kyselina (*Ribonucleic Acid*)

RpsA – ribozomálny proteín S (*Ribosomal protein SA*)

rRNA – ribozomálna ribonukleová kyselina (*Ribosomal ribonucleic acid*)

STR – streptomycín

TBC – tuberkulóza

TDM – trehalóza dimykolát

TLC – tenkovrstevná chromatografia (*Thin Layer Chromatography*)

TMM – trehalóza monomykolát

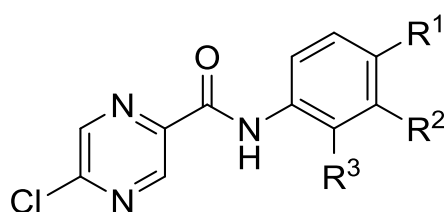
tRNA – transferová ribonukleová kyselina (*Transfer Ribonucleic Acid*)

WHO – Svetová zdravotnícka organizácia (*World Health Organisation*)

XDR – extenzívna lieková rezistencia (*Extensive Drug Resistance*)

2. CIEĽ DIPLOMOVEJ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce je príprava série hybridných zlúčenín kombinujúcich vo svojej štruktúre fragment pyrazínamidu a 4-aminobenzoovej kyseliny. Pripravené zlúčeniny boli testované na antimykobakteriálnu aktivitu a doplnkovo tiež na antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu.



$R^1 = \text{COOH}, \text{COO-}n\text{-Pr}$

$R^2 = \text{H}, \text{Cl}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3$

$R^3 = \text{H}, \text{OH}$

Najprv bola vypracovaná literárna rešerš na tému vzťah štruktúra-účinok skôr pripravených derivátov, a potom návrh finálnych štruktúr. Sústredilo sa na perspektívne látky a na metódy ich prípravy. Ťažiskom činnosti bola experimentálna práca.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1. Tuberkulóza

V roku 1882 objavil Robert Koch bacil *Mycobacterium tuberculosis* complex, zodpovedný za jednu z najsmrteľnejších infekcií – tuberkulózu (TBC).^{1,2} Ročne spôsobujúce až milióny úmrtí, toto infekčné ochorenie predstavuje závažný celosvetový problém, ktorý vyžaduje adekvátne riešenie. Tuberkulózu je možné deliť na pľúcnu a mimopľúcnu formu, pričom pľúcna forma predstavuje približne 85 % prípadov ochorení. Pod ostávajúcich 15 % spadá mimopľúcna forma, postihujúca prevažne pleuru, lymfatické uzliny, kosti, kĺby alebo urogenitálny trakt. Z komplexov mykobaktérií je najčastejší pôvodca tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*), ďalej sú identifikované kmene ako *M. avium*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. kansasii* a *M. microti*.¹

3.2. Epidemiológia

Radiace sa pred HIV/AIDS, tuberkulóza je podľa WHO deviate najsmrteľnejšie ochorenie. Čo sa týka infekčných chorôb, je TBC na prvom mieste v počte úmrtí. V roku 2016 bolo celosvetovo zaregistrovaných 10,4 miliónov prípadov, z čoho 1,3 miliónov úmrtí. Najväčšia incidencia bola vyzorovaná v juhovýchodnej Ázii, Afrike a západnom Pacifiku. India, Indonézia, Čína, Filipíny a Pakistan patria medzi päť najzaťaženejších zemí – 56 % svetových prípadov.³

Globálne sa úmrtnosť na TBC znižuje o 3 %, incidencia približne o 2 %, pričom snaha WHO je do 2020 dosiahnuť 4–5 % medzi 2000–2016 bolo registrovaných 44 miliónov úmrtí medzi HIV negatívnymi prípadmi, zatiaľ čo HIV pozitívny reprezentujú cca tri milióny zomrelých. Rezistentná forma TBC je stále významným rizikom s 480 000 nových prípadov za rok 2016, čo poukazuje na závažnosť tejto problematiky.⁴

V Českej republike (ČR) bolo v roku 2016 nahlásené do Registru tuberkulózy celkom 517 ochorení tuberkulózou všetkých foriem, tj. 4,9 prípadov na 100 000 obyvateľov. V porovnaní s predchádzajúcim rokom teda takmer nedošlo ku zmene stavu. Z dlhodobého hľadiska vykazuje

počet ochorení TBC v ČR klesajúci trend a v medzinárodnom porovnaní patrí k zemiám s nízkym výskytom choroby.⁵

3.3. Pôvodca – *Mycobacterium Tuberculosis*

M. tbc je obligátorne aerobná baktéria charakteristická svojím pomalým rastom a replikáciou (generačná doba je približne 20 hodín).⁶ Tento Grampozitívny (G+) patogén vlastní komplexný bunečný obal, zložený z troch vrstiev: cytoplazmatická membrána, bunečná stena a vonkajšia nekovalentne pripojená vrstva glykánov, lipidov a proteínov.⁷

Vďaka svojmu vysoko lipofilnému obsahu predstavuje bunečná stena hlavnú zložku virulencie mykobaktérií. Mykobateriálna stena je tvorená zosieťovaným peptidoglykánom, na ktorý sú naviazané arabinogalaktany esterifikované dlhými masnými kyselinami – tzv. mykolovými kyselinami. Mykolové kyseliny druhu *M. tbc* majú štruktúru β -hydroxy kyselín s hlavným reťazcom o dĺžke 54–63 uhlíkov (tzv. distálny reťazec). V polohe α je potom naviazaný postranný alkylový reťazec o dĺžke 22–24 uhlíkov (proximálny reťazec). Distálny reťazec obsahuje jeden až dva cyklopropánové kruhy, prípadne methoxy alebo karbonylové skupiny. Konfigurácia v okolí niektorých cyklopropánových kruhov môže byť *trans*.⁸

3.4. Patogenita a rizikové faktory

Tuberkulóza sa šíri predovšetkým vzdušnou cestou kvapkovým prenosom. Zdrojom ochorenia je najčastejšie chorý človek. Po prieniku do organizmu, čo je väčšinou do pľúc, sú mykobaktérie makrofágmi zanesené do pľúcnych lymfatických uzlín. Makrofágy spolu s lymfocytmi (T i B) spôsobujú bunečnú imunitnú odpoveď, pri ktorej dôjde k uvoľneniu mediátorov zápalu (interleukíny, interferon gama, tumor nekrotizujúci faktor) a aktivácii bunečnej obrannej reakcie. Tento proces vedie ku vzniku ložísk, takzvaných granulómov (GR). Infikované ložisko a infikovaná lymfatická uzlina sú označované ako primárny komplex. Odtiaľ môže dôjsť k rozšíreniu mykobaktérií lymfatickými cestami do ďalších orgánov (meningy, urogenitálny systém, kĺby, kosti, koža), kde vznikajú sekundárne

GR. GR môžu vo svojom centru nekrotizovať a rozpadnúť sa, čo je označované ako kaseifikácia. Mykobaktérie sú v malých GR spravidla imunitnou reakciou zničené, kdežto u veľkých GR dôjde k opúzdreniu a následne kalcifikácii. V centre granulómu sú mykobaktérie pre imunitné bunky neprístupné a v dominantnej podobe môžu v organizme po rôznej dlhú dobu prežívať. Oslabenie imunity, môže spôsobiť reaktiváciu alebo reinfekciu ochorenia. V prípade, že dôjde k prieniku mykobaktérií do krvného riečiska, dochádza k vytvoreniu GR prakticky vo všetkých orgánoch. Tento stav predstavuje generálnu infekciu. Klinicky je spravidla aktívna TBC chronický proces, ktorý môže unikať pozornosti a toto ochorenie by vždy malo byť zvažované pri symptómoch ako chronická únava, subfebrília, nočné potenie, chudnutie a pri dlhodobom kašli z počiatku bez, a neskôr s produkciou sputa. U imunologicky slabých pacientov môžu pľúcne i mimopľúcne ochorenie spôsobiť tiež patogénne mykobaktérie, ktoré sú zodpovedné za ochorenia u zvierat.⁹

Rizikové faktory pre vznik choroby predstavuje vysoký vek, alkoholizmus, oslabenie imunitného stavu liečbou, žiarením, inými chorobami, zlými životnými a sociálnymi podmienkami, stresujúce situácie, zlé či slabé sociálne zázemie, drogová závislosť apod.^{1,10} Vzácnejšie môže k ďalšej nákaze dôjsť tzv. exogénnou superinfekciou. Ide o situáciu, kedy je jedinec opätovne vystavený masívnej expozícii *M. tbc* s následným vyvolaním ochorenia.¹

3.5. Diagnostika a klinické príznaky

Príznaky TBC nie sú úplne typické. Radíme medzi nich celkovú únavu, zvýšené teploty, kašeľ, suchý i s expektoráciou sputa, výrazné nočné potenie, niekedy aj hemoptýzu. Môže dôjsť k váhovému úbytku niekoľko kilogramov behom krátkej doby. Symptómy môžu pretrvávať aj cez antibiotickú (ATB) liečbu. Niektorí chorí ich banalizujú a vyhľadávajú lekársku pomoc až po niekoľkých mesiacoch ich trvania. V klinickom obraze dominuje celkové neprospievanie, schvätenosť, niekedy kachexia, známky hypoxémie.¹

Veľmi dôležitým vyšetrením je skiagram hrudníku v zadoprednej a bočnej projekcii. Pre TBC sú typické nehomogénne a neohraničené infiltráty predovšetkým v horných pľúcnych poliach, aj keď ich prítomnosť v iných partiách pľúc TBC nevylučuje. Röntgenový nález môže byť sprevádzaný rozpadmi pľúcnych tkanív – tzv. kavernami. Pre liečbu TBC je typická veľmi pozvoľná regresia röntgenového nálezu, kedy i po dvoch mesiacoch antituberkulotickej liečby sú ešte viditeľné patologické nálezy.¹

Diagnosticky najprínosnejším vyšetrením je mykobakteriálne vyšetrenie sputa, odobraného tkanivá či akéhokoľvek iného biologického materiálu. Jedná sa o zlatý štandard v diagnostike TBC. Obdobne diagnosticky prínosné je histologické overenie ochorenia s preukazom špecifického granulomatózneho procesu s bunkami Langhansového typu a kaseóznou nekrózou. V týchto prípadoch je nutné odoslať resekované tkanivo tiež k bakteriologickému vyšetreniu a preukazu *M. tbc*. Najčastejšie vyšetrenie je odobranie ranného sputa (sputum je odobrané minimálne trikrát). Cieľom vyšetrenia je preukázanie acidorezistentných tyčínok, ktoré sú typické pre mykobakteriálne kmene. Ďalším krokom je kultivačné vyšetrenie, pri ktorom je pozorovaný nárast bakteriálnej kultúry. Pre *M. tbc* je typický veľmi pomalý rast a konečné zhodnotenie výsledkov kultivácie sa prevádza za sedem týždňov. K rýchlemu preukazu *M. tbc* sa stále viac užívajú vysoko citlivé molekulárno-genetické metódy založené na preukazu nukleových kyselín, kedy je identifikácia možná behom niekoľko hodín. Pre úplnú a správnu diagnózu TBC je nutná ešte identifikácia mykobakteriálneho kmeňa a následne i stanovenie citlivosti kmeňa na základné antituberkulotiká (AT) 1. línie. Tieto vyšetrenia potom tvoria podklad adekvátnej liečby AT.¹

Ďalšími možnosťami diagnostiky sú nepriame diagnostické testy, kde spadá tuberkulínový kožný test. Jeho pozitivita je hodnotená ako zdurenie, nie iba začervenanie kože, o priemeru 5 mm a viac. Negatívny tuberkulínový test sa môže vyskytnúť u pacientov s vyšším vekom, imunodeficitným stavom organizmu, či po očkovaní tzv. Bacille-Calmette-Guérin (BCG) vakcínou⁹ aj napriek tuberkulóznemu ochoreniu.¹

QuantiFERON-TBC Gold je ďalším nepriamym testom s vyššou senzitivitou ako test tuberkulínový. Jeho základ tvorí preukázanie interferonu- γ a jeho kvantifikácia.¹

3.6. Prevencia ochorenia

V ČR prevencia tuberkulózy spočíva predovšetkým vo vakcinácii, aj keď plošné povinné očkovanie bolo zrušené. K očkovaniam sa používa živá vakcína z mykobakteriálneho atenuovaného kmeňa *Mycobacterium bovis*,¹ tzv. Bacille-Calmette-Guérin.¹⁰ V minulosti sa v prípade negatívneho tuberkulínového kožného testu u detí vo veku dvoch a jedenástich rokov prevádzala revakcinácia.¹ V dnešnej dobe sa už v ČR toto opätovné očkovanie nerealizuje. Namiesto toho bola zavedená vakcinácia rizikových skupín detí so zmyslom rýchlej ochrany najviac ohrozených detí v dobe, kedy sú k infekcii najnáchylnejšie.²

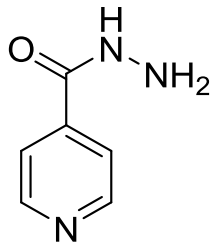
3.7. Farmakoterapia

Princípy liečby TBC vychádzajú z poznatkov o metabolickej aktivite a heterogenite mykobakteriálnej populácie. Desiatky rokov sa kliečbe nerezistentnej formy TBC používajú takzvané liečivá 1. línie. Jedná sa o baktericídne prípravky zastúpené isoniazidom (INH), rifampicínom (RIF), pyrazínamidom (PZA) a bakteriostatickým ethambutolom (ETH). Vyskytnutie rezistentných kmeňov, multi-rezistentných (MDR) a extrémne-rezistentných (XDR) voči základným liečivám viedlo k zavedeniu antituberkulotík 2. línie. Konkrétne sa jedná o fluorochinolóny, aminoglykosidy (streptomycín - STR, amikacín, kanamycín), polypeptidy (kapreomycín, viomycín), thionamidy (ethionamid, prothionamid), cykloserín a *p*-aminosalicylovú kyselinu (PAS).¹

Od roku 2012 schválila FDA používanie novo vyvinutých liečiv, pod ktoré spadá bedachilín, pretomanid a delamanid. Linezolid, klofazimin a β -laktamy patrí medzi liečivá ku ich indikácii bola novo pridaná TBC.¹¹ Charakteristiky vymenovaných liečiv budú nižšie prebrané podrobnejšie.

3.7.1. Liečivá 1. línie

ISONIAZID



-hydrazid isonikotínovej kyseliny¹²

Zlúčenina jednoduchej štruktúry, zložená z pyridínového kruhu a hydrazidovej skupiny, pričom oba štruktúrne rysy sú nevyhnutné pre aktivitu.¹³ Je používaná v kombináciách s ďalšími antituberkulotikami pri liečbe pľúcnej a mimopľúcnej TBC, samostatne iba k profylaxii TBC.¹² Na pomaly rastúce mykobaktérie má bakteriostatický účinok, zatiaľ čo na rýchlo rastúce má účinok baktericídny.¹⁴ Kvôli nízkej lipofilite tejto zlúčeniny je pre prestup do bunky nevyhnutná pasívna difúzia cez porínové proteíny bunecnej steny mykobaktérií.¹⁵

Mechanizmus účinku:

Je to proliečivo, ktoré je oxidatívne konvertované pomocou mykobakteriálneho enzýmu kataláza-peroxidáza KatG, ktorý oxidatívne konvertuje toto proliečivo za účasti NAD⁺ na isonikotinoylový radikál. Vzniknutý radikál sa následne kovalentne viaže na NADH, pričom sa vytvára INH-NADH adukt, ktorý predstavuje aktívnu formu INH. Vzniknutý adukt inhibuje radu enzýmových systémov, ktoré využívajú NAD k syntéze mykolových kyselín. Najznámejším inhibovaným enzýmom je enoyl-ACP reductáza InhA, ktorá je súčasťou enzymatického komplexu FAS II. InhA je tak základná pre tvorbu mykolových kyselín – hlavných lipidov tvoriacich obal mykobakteriálnej steny.¹³

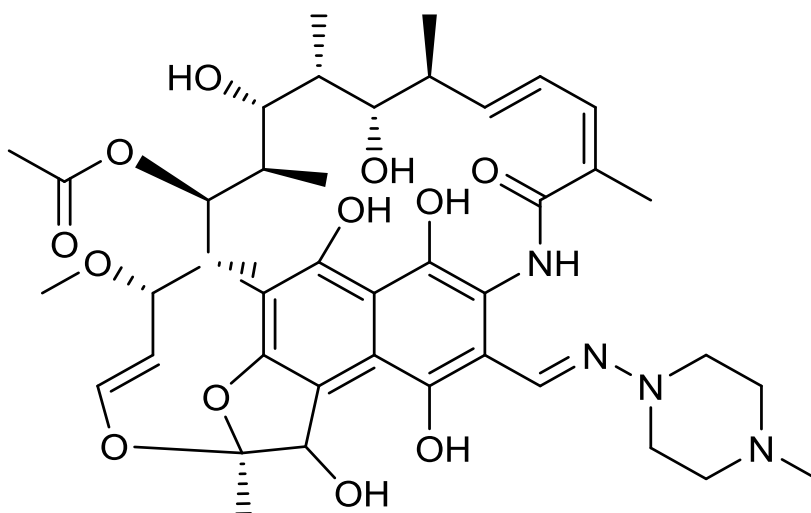
Rezistencia:

Najčastejšie je spôsobená mutáciou génu kódujúcim KatG proteín, v ktorom je serínový zbytok v pozícii 315 nahradený threonínom. Ďalšou mutáciou je zmena v promoterovej časti *inhA*, ktorá spôsobuje jeho

nadmernú expresiu, čo vo výsledku vedie k zvýšeniu obsahu enzýmu InhA v bunke.¹³

Nežiadúce účinky: periférna neuropatia, hepatitída, agranulocytóza, hemolytická, aplastická alebo sideroblastická anémia, nedostatok pyridoxínu.¹⁴

RIFAMPICÍN



Štruktúrne je to makrocyclický laktam patriaci do skupiny ansamycinových antibiotík.¹² Baktericídna zlúčenina pôsobí na deliace sa aj na perzistujúce baktérie.⁷

Mechanizmus účinku:

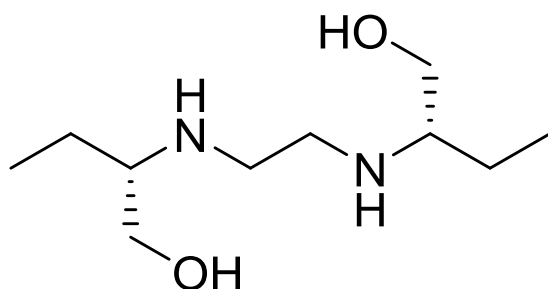
Rifampicín sa viaže na β -podjednotku DNA-dependentnej RNA polymerázy, čo vedie k inhibícii syntézy nukleových kyselín.^{12,16,17}

Rezistencia:

Je spôsobená mutáciou *rpoB* génu, kódujúceho β -podjednotku DNA-dependentnej RNA polymerázy¹⁸ a je skrížená s ostatnými ansamycinovými ATB.¹⁶

Nežiadúce účinky: hepatitída, hypotenzia, zlyhanie obličiek, spôsobuje sfarbenie všetkých telových tekutín do oranžovo-červena.¹⁶

ETHAMBUTOL



-derivát ethylendiamínu¹²

Opticky aktívna zlúčenina typu aminoalkoholu s dvoma izolovanými chirálnymi atómami uhlíku, pričom aktívny je iba pravotočivý *S,S*-(+)-izomér.¹² Bakteriostaticky pôsobí proti aktívne rastúcim mykobaktériám.¹⁹

Mechanizmus účinku:

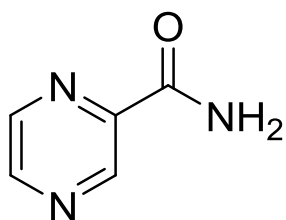
Nie je doposiaľ plne objasnený. Hlavný podiel tvorí narušenie polymerizácie arabinózy v bunečnej stene mykobaktérií. Miestom jeho účinku je arabinofuranosyltransferáza, ktorá katalyzuje biosyntézu lípoarabinomannanu nevyhnutného pre zachovanie integrity mykobakteriálnej steny.¹²

Rezistencia:

Mutácia *emb* génov (najčastejšie *embB*) kódujúcich arabinosylfuranosyltransferázy.¹⁹

Nežiadúce účinky: optická neuropatia vrátane optickej neuritídy a retrobulboárnej neuritídy, zníženie vizuálnej ostroti a farbosleposť, hepatotoxicita.¹⁹

PYRAZÍNAMID



Vzhľadom k tomu, že sa táto diplomová práca venuje derivátom pyrazínamidu, bude pri deskpcii používaných antituberkulotík braný najväčší ohľad na túto zlúčeninu. Štruktúralne sa jedná o amid pyrazín-2-karboxylovej kyseliny (analog nikotínamidu), proliečivo, ktorého aktívna forma je pyrazín-2-karboxylová kyselina (POA). Je charakteristický pre svoje pôsobenie na viacero cieľových štruktúr.¹³ Kyslé prostredie zápalu je vhodné pre účinok pyrazínamidu, ktorý pri pH cca 5,5 vykazuje sterilizačnú aktivitu proti perzistujúcim bunkám v makrofágoch, čo umožňuje skrátenie liečby TBC.²⁰ Je tým pádom vhodným liečivom pri kombináčnej terapii TBC aj MDR-TBC.²⁰ Pyrazínamid (PZA) tiež vykazuje letálny účinok voči semi-dormantným bunkám vo vnútri makrofágov.¹³

Mechanizmus účinku:

Pôsobenie PZA je nejednoznačné a doposiaľ nie úplne objasnené, je však možné rozdeliť jeho pôsobenie na špecifické a nešpecifické.

Nešpecifické pôsobenie PZA bolo vysvetlené ako prekyslenie bunecnej cytoplazmy vedúce k inhibícii životu nevyhnutných enzýmov a porušenie protónového prenosu.²⁰

Ako už bolo spomenuté, pyrazínamid je proliečivo, ktoré vstupuje do bunky pasívnou difúziou. Na svoju aktívnu formu (POA) je konvertované pomocou pyrazinamidázy/nikotinamidázy kódovanej *pncA* génom v *M. tbc*.²⁰ Negatívne nabitá POA (pKa 2,9) je potom eliminovaná z cytoplazmy nedefinovaným mechanizmom.²¹ V extracelulárnom prostredí pri pH cca 5,5 je malé množstvo POA protonizované na HPOA, ktorá prechádza cez membránu, a tým dokončuje cyklus, ktorý po niekoľko opakovaní vedie k acidifikácii a pleiotropnému poškodeniu celulárneho mechanizmu.²⁰

Novšie štúdie ukázali, že inhibícia rastu *M. tbc* PZA či POA nemusí byť podmienená intra či extracelulárnym kyslým pH a nie je prisudzovaná protónovému prenosu a cytoplazmatickej acidifikácii. V skutočnosti vedie nadmerná expresia *pncA* k zvýšeniu citlivosti na PZA v neutrálnom, či alkalickom pH.²¹ Ďalej, baktericídne účinky PZA sú zachované v médiu neutrálneho pH a koncentrácie PZA, ktoré plne inhibovali rast mykobaktérií nespôsobili cytoplazmatickú acidifikáciu.²¹

Medzi špecifické ciele PZA patrí RpsA (ribosomálny proteín S1) umožňujúci trans-transláciu (proces odstraňujúci toxické proteínové produkty formované za stresových podmienok).²⁰

Ďalším možným cieľom je aspartát dekarboxyláza (PanD) kódovaná *panD* génom.¹³ PanD sa zúčastňuje syntézy β -alanínu, ktorý je prekursor v biosyntéze pantotenátu a koenzýmu A.²⁰

PZA a POA sú štruktúrnymi analógmi chinolinovej kyseliny (QA). Fosforibosyltransferáza chinolinovej kyseliny (QAPRTáza) je kľúčový enzým v *de novo* biosyntéze NAD. QAPRTáza katalyzuje Mg^{2+} -závislý prenos fosforibosylovej zložky z 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu na dusíkový atóm chinolinovej kyseliny k vytvoreniu mononukleotidu nikotínovej kyseliny, pyrofosfátu a CO_2 .²² Vďaka štruktúrálnej podobe PZA s QA dochádza k jeho využitiu ako falošného substrátu pre QAPRTázu, čo vedie k inhibícii tohto enzýmu.²²

Rezistencia:

Najčastejšou príčinou rezistencie je mutácia *pncA* génu, kódujúcom pyrazínamid/nikotínamidázu.²³

Iný typ rezistencie predstavuje mutácia génu *panD* kódujúceho aspartát dekarboxylázu. Dochádza k pozmenenej štruktúre PanD, na ktorú už PZA nepôsobí.²⁰

Rezistencia voči PZA u *M. tbc* môže byť tiež dosiahnuto nadmernou expresiou *rpsA*.¹³

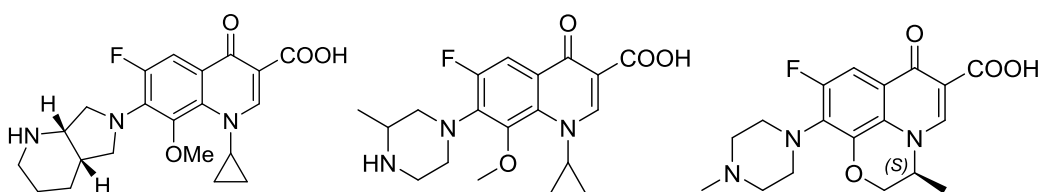
Veľmi efektívny eflux POA u *M. smegmatis* a *M. avium* spôsobuje ich rezistenciu voči PZA, aj napriek prítomnosti účinnej pyrazínamidázy.¹³

Nežiadúce účinky: hepatotoxicita, gastrointestinálne potiaže (zvracanie, nauzea, nechutenstvo), hyperurikémia.²³

3.7.2. Liečivá 2. línie

Druhá línia antituberkulotík sa riadi medzi liečivá indikovaná výhradne na rezistentné formy TBC. Aj keď sú v terapii tiež nenahraditeľné, majú radu nevýhod, preto k indikácii dochádza až pri zistení komplikovanej formy TBC. Nevýhodami sú najmä znížená účinnosť, vyšší výskyt nežiadúcich účinkov a v poslednej rade aj nedostupnosť niektorých liečiv v rozvojových zemiach, kde je výskyt TBC najvyšší.

FLUROCHINOLÓNY – moxifloxacín, gatifloxacín, levofloxacín



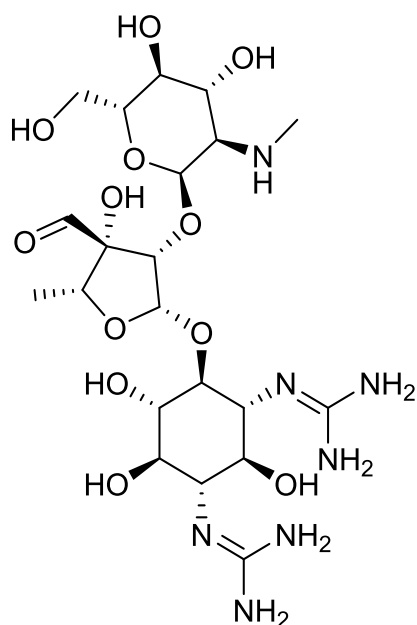
moxifloxacín

gatifloxacín

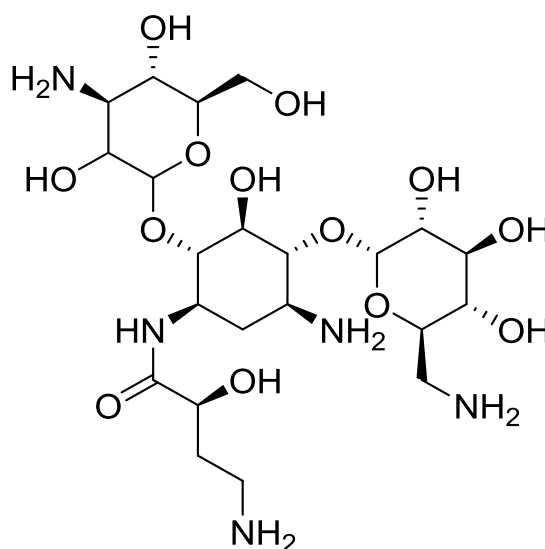
levofloxacín (ľavotočivý
izomér ofloxacínu)

Flurochinolóny nepredstavujú typické antituberkulotiká, avšak od konca minulého storočia sa k ich indikáciám zaradila aj rezistentná forma TBC.^{24,25} Majú baktericídny účinok javiaci sa cez inhibíciu mykobakteriálnej topoizomerázy II (DNA gyráza), ktorá je zodpovedná za správne rozvoľnenie a znovu zretžazenie DNA behom replikácie.²⁶ Najefektívnejšie flurochinolóny sú moxifloxacín a gatifloxacín, nasledované levofloxacínom a ofloxacínom.²⁵ Levofloxacín je S-(-)-forma ofloxacínu.²⁷ Medzi všetkými flurochinolónmi sa vyskytuje skrížená rezistencia²⁶, avšak nie s ostatnými antituberkulotikami.²⁵

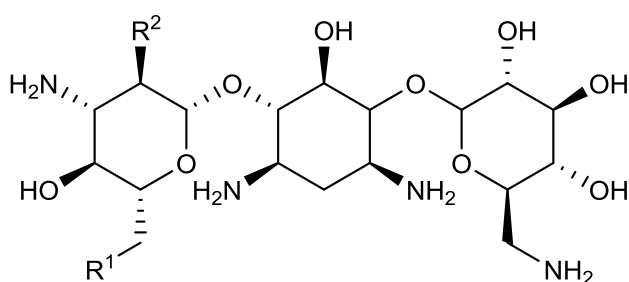
AMINOGLYKOSIDOVÉ ANTIBIOTIKÁ – streptomycín, amikacín, kanamycín



streptomycín



amikacín



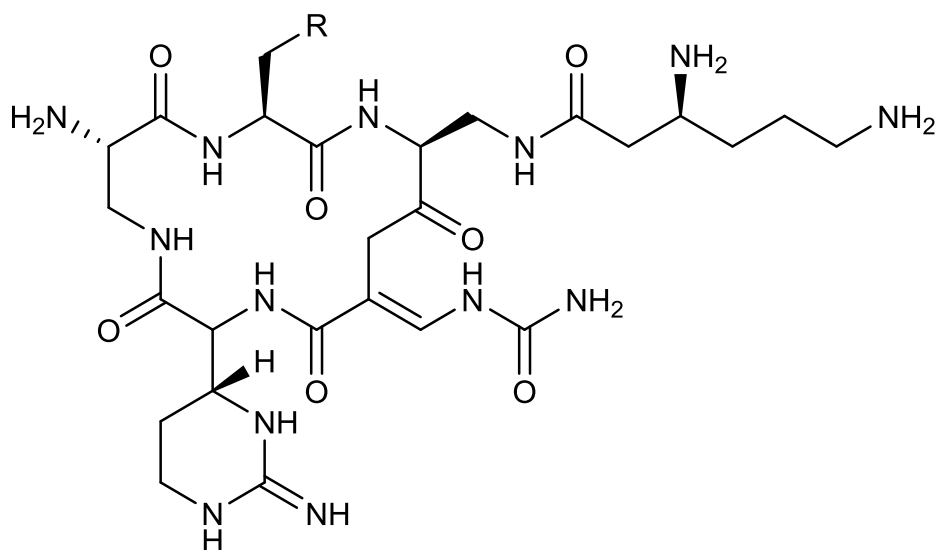
kanamycín

A: R¹ = NH₂, R² = OH
B: R¹ = NH₂, R² = NH₂
C: R¹ = OH, R² = NH₂

Jedná sa o prírodné ATB izolované z rodu *Streptomyces* (amikacín je polosyntetický²⁸, derivovaný z kanamycínu).²⁵ Streptomycín bol objavený v roku 1944 a stal sa prvým liečivom efektívnym proti tuberkulóze.²⁵ Aminoglykosidy majú baktericídne pôsobenie cez inhibíciu proteosyntézy bakteriálnej bunky ireverzibilným naviazaním na 30S podjednotku ribozómu.^{28,29} Štrukturálne to sú trisacharidy až tetrasacharidy obsahujúce neobvyklé aminosacharidy.²⁸ Vzhľadom k obsahu vysoko polárnych aminoskupín sú veľmi polárne bázické

molekuly, ktoré za fyziologických podmienok existujú vo forme polykatiónov. Z tohto dôvodu sa vôbec nevstrebávajú, a preto je nutné intravenózne alebo intramuskulárne podanie.²⁸ Medzi amikacínom a kanamycínom existuje skrížená rezistencia.²⁵ K ich najväznejším nežiadúcim účinkom patrí ototoxicita a nefrotoxicita.²⁸

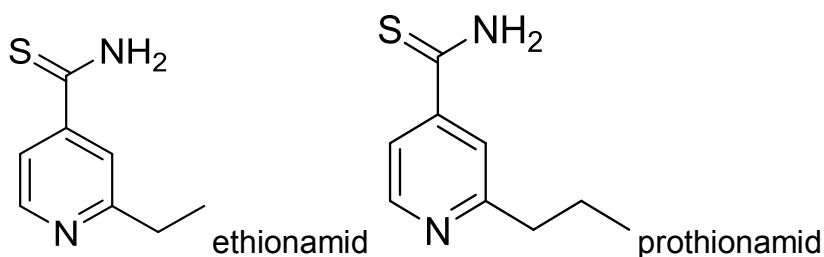
POLYPEPTIDOVÉ ANTIBIOTIKÁ – kapreomycín



kapreomycín

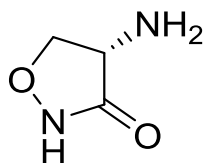
Polypeptidy predstavujú druhú skupinu injektabilných antituberkulotík. Do ich spektra účinku spadá *M. tbc* a *M. avium*.³⁰ Mechanizmus účinku nie je jasne vysvetlený, ale zdá sa, že inhibujú translokáciu peptidylovej tRNA a cez interakciu s ribozómami inhibujú proteínovú syntézu.²⁹ Baktericídnu aktivitu vykazujú iba proti nereplikujúcim sa mykobaktériám. Nežiadúce účinky sú podobné aminoglykosidovým ATB – nefrotoxicita, ototoxicita a elektrolytová porucha – hypokalémia.^{25,29,30} Kapreomycín je získavaný zo *Streptomyces capreolus*, ako antituberkulotikum je používaný od roku 1959.²⁵

THIOAMIDY ISONIKOTÍNOVEJ KYSELINY – ethionamid, prothionamid

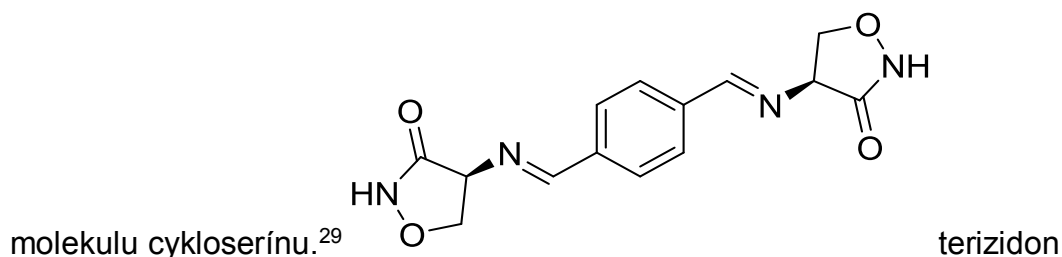


Tieto antituberkulotiká inhibujú syntézu mykolových kyselín, ale ich presný mechanizmus nie je známy.²⁹ Keďže sa jedná o látky podobné isoniazidu, majú s ním aj skríženú rezistenciu.²⁹ Rovnako ako INH, sú to proliečivá. Na svoju aktívnu formu sú aktivované mykobakteriálnou flavoproteínovou monooxygenázou (tj. monooxygenáza obsahujúca flavín adenín dinukleotid).³¹ Thioamidy sú baktericídne ATB, ktoré tohoto účinku dosahujú inhibíciou enoyl-ACP-reduktázy produkovanou *inhA* génom.^{31,32} Ethionamid je používaný ako antituberkulotikum 2. línie od roku 1956.²⁵ Jeho nežiadúce účinky sú podobné INH – hepatotoxicita, neurotoxicita, gastrointestinálne potiaže.²⁵

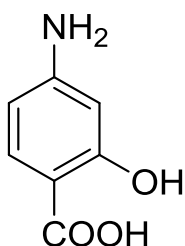
CYKLOSERÍN, TERIZODON



Cykloserín je analóg aminokyseliny D-alanínu.³³ Inhibuje alanín racemázu (konvertuje L-alanín na D-alanín) a D-alanín:D-alanín ligázu, ktorá syntetizuje pentapeptidové jadro použitím D-alanínu (oba enzýmy sú esenciálne pre tvorbu peptidoglykán).³³ Je to širokospektrálne ATB. V závislosti na koncentrácii môže mať bakteriostatické až baktericídne účinky. Najčastejšie je používaný v kombinácií piatich liekov na liečbu *M. avium* komplexu a *M. tbc*.³³ Terizidon predstavuje zdvojenú



KYSELINA PARA-AMINOSALICYLOVÁ



PAS predstavuje ďalšiu dôležitú zložku predlohovej štruktúry derivátov pripravovaných v rámci tejto diplomovej práce. Z tohto dôvodu bude väčšia pozornosť venovaná tiež tomuto liečivu. PAS bola používaná ako antituberkulotikum od roku 1946.²⁵ Do sedemdesiatych rokov minulého storočia sa používala ako antituberkulotikum 1. voľby²⁵ do jej náhrady lepšie tolerovaným ethambutolom.¹³ Zlúčenina vykazuje prevažne bakteriostatický účinok.²⁵ V praxi bola používaná v kombinácií s INH a STR¹³ pre jej významnou rolu pri prevencii vzniku rezistencie mykobaktérií voči týmto liečivám.³⁴ Preventívny účinok PAS sa odvíja od veľkosti podanej dávky, pričom najlepších výsledkov je dosiahnuto pri 20 g dennej dávke.³⁴ Nutnosť podania vysokých dávok však predstavuje jeden z dôvodov, z ktorých došlo k vyradeniu tohto liečiva v liečbe tuberkulózy vo vyspelých zemiach¹² (od 12 g narastá intolerancia voči PAS, manifestujúca sa nauzeou, GIT problémami, zvracaním, hnačkou).³⁴ Ďalší z dôvodov je veľké riziko rezistencie.¹²

Mechanizmus účinku:

Podobne ako u iných proliečiv, mechanizmus účinku PAS je komplexný a doposiaľ nie úplne známy.¹³ K prejavu svojej aktivity, PAS musí byť najskôr prevedená na svoju aktívnu formu.

Ako blízky analóg *p*-aminobenzoovej kyseliny (PABA), PAS je inhibítor dihydrofolát reduktázového enzýmu (DHFR). Je teda nevyhnutná jej konverzia dvoma enzymatickými reakciami na hydroxydihydrofolát (hydroxy-H₂PteGlu), ktorý je pravý inhibítor DHFR. V skutočnosti PAS funguje ako falošný substrát dihydropteroátsyntázy (DHPS) a tak je biokonvertovaná, podobne ako PABA na hydroxy-dihydropteroát (hydroxy-H₂Pte) cez *M.tbc* folát syntázovú cestu (funguje ako falošný

substrát dihydrofolátreduktázy-DHFR). Prvým krokom tohoto procesu je N-alkylačná reakcia arylaminovej skupiny PAS s 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterín pyrofosfátom (DHPPP), vedúca k formácii hydroxy-H₂Pte.¹³

V druhom kroku dochádza k amidifikácii karboxylovej kyseliny s hydroxy-H₂Pte (tiež falošný substrát DHFS) pomocou L-glutamátu vedúci k hydroxy-H₂PteGlu.¹³ Niekoľko štúdií ukazuje, že hydroxy-H₂PteGlu (analóg H₂PteGlu) tiež narušuje folátový metabolizmus potenciálnou inhibíciou DHFR, čím je zodpovedný za akumuláciu a nevyužitie folát závislých metabolitov ako deoxyuridín monofosfát (dUMP).¹³

Po aktivácii spočíva hlavný účinok v inhibícii DHFR, kódovanou *dfrA* génom a účastniaca sa folátového metabolizmu pri konverzii dihydrofolátu (H₂PteGlu) na tetrahydrofolát (H₄PteGlu). Vid' Schéma 1. H₄PteGlu slúži ako kofaktor pri prenose jednouhlíkového zbytku v syntéze niekoľkých esenciálnych bakteriálnych komponent ako je methionín, glycín, serín, panthotenát, puríny a thymidín.^{13,35} H₄PteGlu je konvertovaný na 5,10-methyléntetrahydrofolát, ktorý je použitý pri premene dUMP na deoxythymidín monofosfát (dTMP). Tento proces je katalyzovaný thymidylát syntázami ThyA a ThyX, ktoré mimo iné hrajú rolu pri vzniku rezistencie na PAS.¹³ Z predošlého plynie, že inhibícia DHFR vedie k disrupcii methyltransferázovej funkcie a nedostatku dTMP, čo spôsobuje stratu životnosti bunky.

PAS bola považovaná za kompetitívny inhibítor tiež DHPS.³⁶ Neskoršie poznatky viedli k záveru, že PAS slúži ako substrát pre DHPS, pričom dochádza k vzniku toxických analógov H₂PteGlu. Inhibíciu DHPS následne sprostredkujú až vzniknuté metabolity³⁵, podobne ako v inhibícii DHFR.

Vo svojej aktívnej forme môže PAS porušiť mykobakteriálne získavanie železa pomocou nekompetitívnej inhibície inkorporácie salicylátu do mykobakteriálnych siderofórov, mykobaktínu a karboxymykobaktínu.¹³ Tohoto môže byť dosiahnuto mimo iné tiež chelatáciou katiónu železa. Po chelatácii skôr zmienených iónov dôjde k zabráneniu ich prenosu prostredníctvom ionofóru mykobaktínu.¹²

Rezistencia:

Vznik rezistencie môže byť vysvetlený nasledujúcimi javmi:

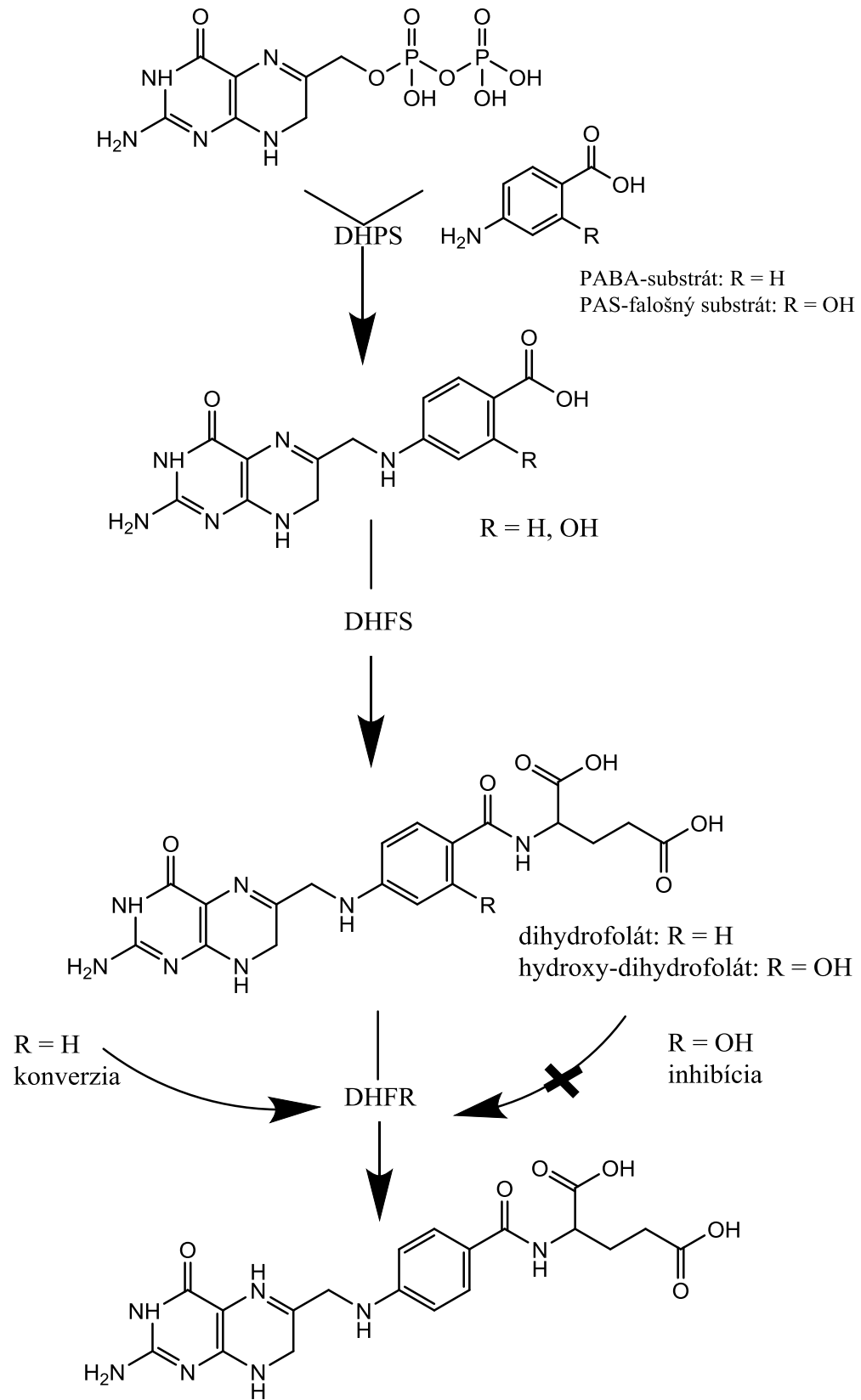
- mutácia vo *folC* génu, kódujúceho DHFS, enzým aktivujúci PAS¹³
- DHFR katalyzuje konverziu H₂PteGlu na H₄PteGlu, ale iný enzým RibD, (riboflavin biosynthesis protein), môže tiež vytvárať H₄PteGlu s dostatočným množstvom pre bakteriálne prežitie. V niektorých PAS rezistentných kmeňoch, rezistencia je spojená s nadmernou expresiou *ribD*.¹³

V kontraste väčšiny bakteriálnych patogénov, *M. tbc* je unikátna v tom, že kóduje ThyA aj ThyX typ thymidylát syntázy. Konverzia dUMP na dTMP je teda tvorená dvoma cestami:

1. cez ThyX, v ktorom 5,10-m-H₄PteGlu je transformovaný na H₄PteGlu
 2. cez ThyA, v ktorom je 5,10-m-H₄PteGlu konvertovaný na H₂PteGlu
- Z toho vyplýva, že ďalšou cestou zníženia PAS efektu je mutácia *thyA* génu vedúca k nefunkčnej ThyA.^{13,36}

Nežiadúce účinky: najčastejšie sú to gastrointestinálne problémy (zvracanie, hnačka, nauzea), hypotyreoitída, hepatitída, hemolytická anémia, agranulocytóza a malabsorpčný syndróm.

Schéma 1: Mechanizmus účinku PAS

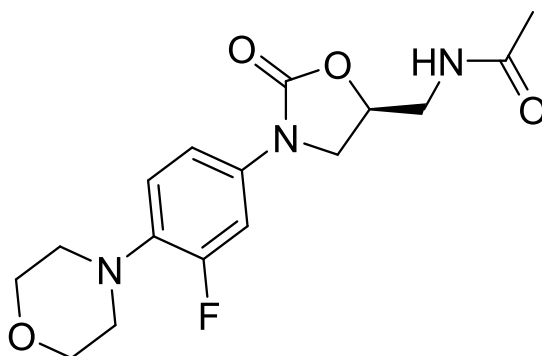


3.7.3. Liečivá nové a naďalej vyvíjané

1,3-OXAZOLIDINONY – linezolid, sutezolid, posizolid

Oxazolidinony javia sľubný účinok proti rezistentným kmeňom *M. tbc*.²⁴ Ich mechanizmus účinku zahŕňa inhibíciu proteínovej syntézy cez interakciu s ribozomálnou podjednotkou 50S a blokáciu spojenia aminoacylovej tRNA a A miestom peptidyltransferázového centra, znemožňujúce tak translačný proces. Jedinečnosť tohto mechanizmu spočíva v inhibícii rannej proteínovej syntézy v iniciačnej fáze komplexu 70S, nie vo fáze spočívajúcej v predlžovaní polypeptidového reťazca. Vďaka tomu sa vyhýbajú skríženej rezistencii s makrolidmi, linkosamidmi, streptogramínmi, aminoglykosidmi, tetracyklínmi, chloramfenikolom a fusidovou kyselinou.³⁷

Linezolid je prvý komerčne dostupný zástupca tejto skupiny liečiv.²⁴ Jeho mechanizmus účinku spočíva v naviazaní sa na 23S rRNA a inhibícii translácie v skoršej fáze, zabraňujúce tak správne naviazaniu formyl-methionín tRNA. Dochádza teda k inhibícii syntézy proteínov.³⁸ Je bakteriostatický proti enterokokom a stafylokokom a baktericídny proti streptokokom, pôsobí aj proti *M. tbc* MDR kmene.³⁸ Medzi jeho nežiadúce účinky patrí myelotoxicita, cypopénia, neuropatia, laktátová acidóza, rhabdomyelýza.³⁹

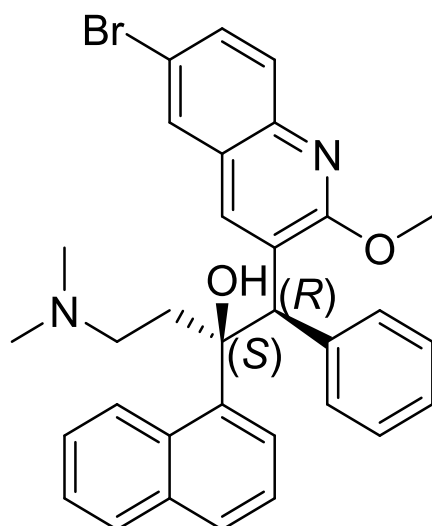


Sutezolid je derivát linezolidu obsahujúci miesto morfolínového kruhu thiomorfolínový substituent. Je aktívny voči piatim citlivým kmeňom *M. tbc* a piatim kmeňom rezistentných na INH, RIF, ETH, STR a môže mať významný vplyv na skrátenie liečby TBC. Štúdiá uvádza, že sutezolid sa

javí ešte bezpečnejším ako linezolid. Aj keď sa jedná o sľubnú látku, sutezolid nie je tohto času ešte komerčne dostupný.³⁷

Posizolid je linezolidový derivát obsahujúci dva fluorové substituenty na fenylovom kruhu. Vykazuje voči *M. tbc* lepšiu aktivitu ako linezolid, aktuálne prebiehajú štúdie v jeho použití v terapii rezistentných kmeňov. Javí však závažne nežiadúce účinky (hepatotoxicita, hematotoxicita) a tým je jeho uvedenie na trh zatiaľ nejasné.³⁷

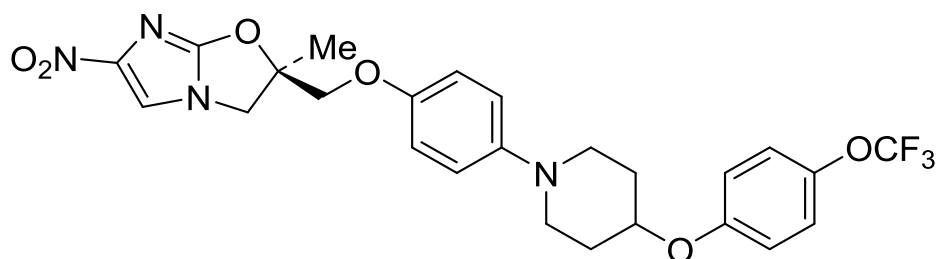
BEDACHILÍN (TMC 207)



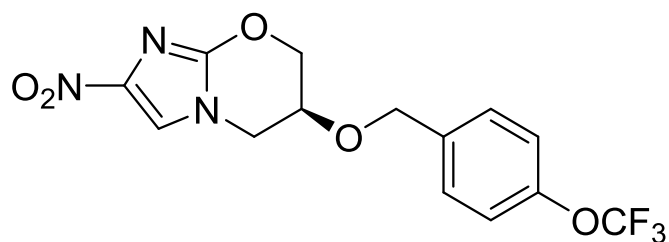
Bedachilín je diarylchinolín ktorý koncom roku 2012 prešiel zrýchleným procesom schválenia FDA k liečbe MDR-TBC u dospelých pacientov.⁴⁰ V ČR bol registrovaný v roku 2014 pod komerčným názvom SIRTURO.⁴¹ Od iných antituberkulotík sa odlišuje svojím jedinečným mechanizmom účinku. Cieľom tohoto liečiva je c podjednotka ATP syntházy. ATP syntháza je rozdelená na F0 a F1 multi-podjednotkové komplexy: F1 je cytoplazmatická a F0 je membránovo asociovaná. C podjednotka je súčasťou F0, čo znamená, že cieľ bedachilínu je na membránovej strane.⁴² Vo výsledku dochádza ku zníženiu ATP v bunke a nerovnováhe v pH. Jedná sa teda o baktericídne liečivo.²⁴ Do spektra aktivity spadajú *M. tbc*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. kansasii* a *M. ulcerans*.⁴²

NITROIMIDAZOLY – delamanid (OPC – 67683), pretomanid (PA824)

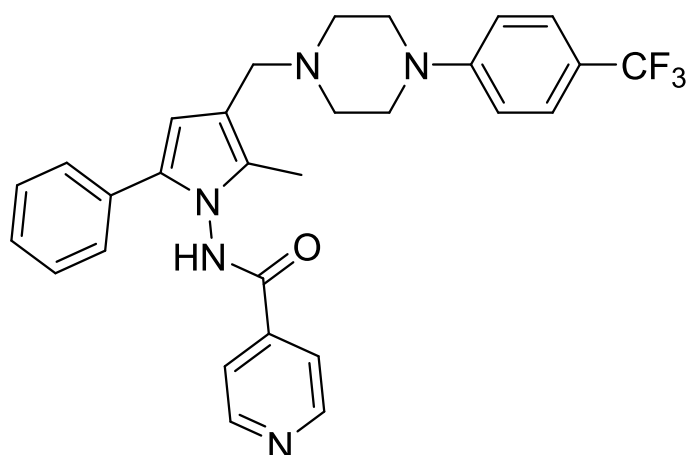
Delamanid (OPC-67683) je proliečivo, jeho aktívna forma inhibuje syntézu methoxy a ketomykolových kyselín, ktoré sú súčasťou mykobakteriálnej bunecnej steny.⁴³ *In vitro* vykazuje baktericídny účinok voči *M. tbc*⁴⁴, do spektra účinku spadá tiež *M. kansasii*. Je vhodný pre použitie na kmene rezistentné na INH, RIF, ETH, PZA, STR.⁴⁴



Pretomanid (PA824) je podobne ako delamanid, proliečivo, ktoré po aktivácii inhibuje syntézu mykolových kyselín a bielkovín. Pravdepodobne účinkuje cez vytváranie radikálov s nešpecificky toxickým efektom.⁴⁵ Aktivácia proliečiva prebieha cez redukciu aromatickej nitro-skupiny kofaktor 420 dependentnou glukóza-6-fosfát dehydrogenázou. Pretonamid ma baktericídny účinok proti replikujúcim a nerastúcim formám *M. tbc*⁴⁵ a to intracelulárnou produkciou oxidu dusnatého.

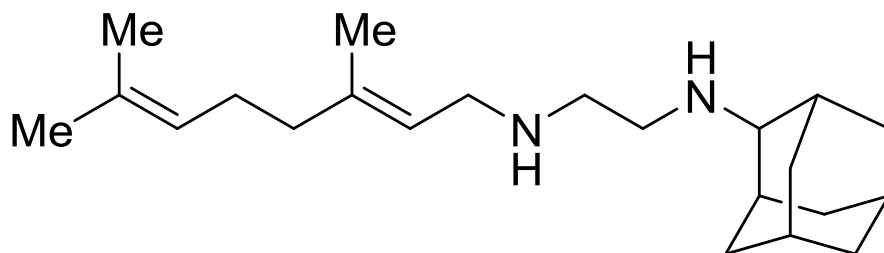


PYRROLY – sutoterb (LL3858)



Sutoterb - je látka, ktorej cieľová štruktúra je zatiaľ neznáma. *In vitro* pôsobí baktericídne proti *M. tbc*. Spolu s RIF dochádza k synergnému pôsobeniu.⁴⁶

DIAMÍNY – SQ109

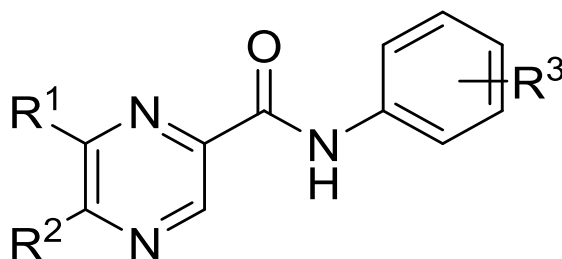


Aj keď sa jedná o analóg ETH, toto liečivo ma úplne iný mechanizmus účinku.⁴⁷ Ten spočíva v inhibícii MmpL3, membránového transportéru pre trehalózu monomykolát (TMM), následkom čoho dochádza k hromadeniu TMM (prekurzor trehalózy dimykolátu – TDM) v cytosóle. Neprebíha teda syntéza TDM a nedochádza k väzbe mykolátov na arabinogalaktany v bunečnej stene.⁴⁸ Do spektra účinku sa radí *M. tbc*, *M. bovis*, *M. marinum*.⁴⁷

3.7.1. Štruktúrne modifikácie pyrazínamidových derivátov a ich vzťah štruktúra-účinok

Časť tejto diplomovej práce spočívala v nájdení vzťahu medzi štruktúrou skôr pripravených derivátov pyrazínamidu a ich biologickým účinkom. Pri veľkom množstve a štruktúrnej rozmanitosti pripravených derivátov pyrazínamidu na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy (viac ako 100 zlúčenín) bolo rozhodnuté zaoberať sa látkami štruktúrne podobnými tým, ktorým je venovaná táto diplomová práca. Do tejto analýzy boli teda zahrnuté deriváty *N*-fenzylpyrazín-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazín-2-karboxamidu.

Deriváty *N*-fenzylpyrazín-2-karboxamidu



Pozitívny vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu proti *M. tbc* H37Rv vykazovali tieto štruktúrne znaky:

- atóm chlóru v pozícii 6 pyrazínového kruhu a v pozícii 4 benzénového jadra⁴⁹
- lipofilné substituenty (CF₃ a CH₃) v polohe 3 a 4 benzénového jadra⁵⁰
- kombinácia halogénového substituentu s methylom, hydroxylom alebo nitro skupinou⁵¹
- substitúcia chlóru za jednoduchý *n*-alkylamino substituent u 5-chlór-*N*-fenzylpyrazín-2-karboxamidu (táto substitúcia tiež viedla k zníženiu ich *in vitro* cytotoxicity)⁵²
- antimykobakteriálna aktivita sa zvyšovala so zvyšujúcou sa lipofilitou a kulminuje u derivátov s hexyl- a heptyl-aminovými substituentami pyrazínového jadra⁵²

- substitúcia chlóru za jednoduchý alifatický alkylamín u 6-chlór-*N*-fenylypyrazín-2-karboxamidov viedla k zvýšeniu aktivity (od propyl- do oktyl-amínu)⁵³
- u 6-alkylamino-*N*-fenylypyrazín-2-karboxamidov sa antimykobakteriálna aktivita zvyšovala so stúpajúcou lipofilitou a vrcholila u zlúčenín s heptylamino substitúciou⁵³, u 5-chlór-*N*-fenylypyrazín-2-karboxamidov lipofilita nekorelovala s antimykobakteriálnou aktivitou⁵¹

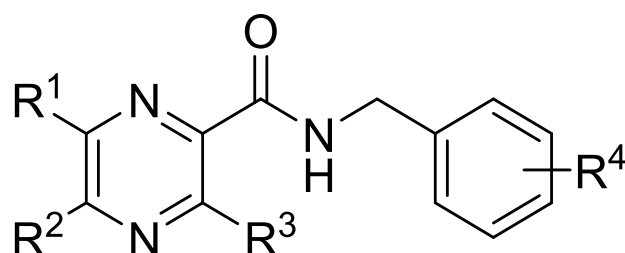
Nasledujúce substituenty viedli k zvýhodnenej aktivite proti iným mykobakteriálnym kmeňom:

- halogénová substitúcia na benzénovom jadre (*M. kansasii*)⁵¹
- atóm chlóru v *meta* polohe fenylového kruhu (možná indikácia pre potrebu veľkého a hydrofóbného substituentu v tejto polohe) (*M. avium*)⁵¹
- alkylaminová substitúcia (hexyl, heptyl) v polohe 5 pyrazínového kruhu (*M. kansasii*)⁵²

Negatívny vplyv na antimykobakteriálnu aktivitu proti *M. tbc* mali tieto štruktúrne znaky:

- *tert*-butylová zložka naviazaná na pyrazín u chlorovaných *N*-fenylypyrazín-2-karboxamidov⁴⁹
- CN- substituent na benzénovom jadre⁵¹
- OH-substituent naviazaný na fenylovom kruhu⁵¹
- substitúcia chlóru za amino skupinu u 5-chlórpyrazín-2-karboxamidov kompletne ruší aktivitu (tento fakt môže byť čiastočne vysvetlený znížením lipofility zlúčenín)⁵⁴
- modifikácia alkylaminového reťazca polárnou skupinou (terminálnou OCH₃ alebo OH skupinou); môže byť spôsobené zníženou lipofilitou vytváraním H-väzieb^{52,53}
- vsunutie aromatického jadra do alifatického reťazca⁵³

***N*-benzylpyrazín-2-karboxamidové deriváty**



Nasledujúce štruktúrne znaky vykazovali pozitívny vplyv na aktivitu proti *M. tbc*:

- methoxylový substituent v polohe 4 a triflórmetyllová skupina v polohe 3 benzénového jadra⁵⁵
- chlór v pozícii 6 a *tert*-butyl v 5. pozícii na pyrazínovom kruhu⁵⁵
- u 5- a 6-alkylamino derivátov antimykobakteriálna aktivita sa zvyšuje s predlžujúcim sa alkylovým reťazcom, pričom maximum vykazuje od hexylu do oktylu⁵⁶
- poloha 5 alkylaminového reťazca na pyrazínovom kruhu je pre biologickú aktivitu výhodnejšia ako poloha 6⁵⁶
- zavedenie druhého fenylového kruhu u derivátov 3-benzylamino-*N*-benzylpyrazín-2-karboxamidu vedie k zvýšeniu antimykobakteriálnej aktivity proti *M. tbc*, ale naopak k zníženiu aktivity proti *M. kansasii*⁵⁷
- elektrón-donorový substituent na benzylovom zbytku (2-CH₃, 4-CH₃, 4-OCH₃), zatiaľ čo elektrón-akceptorový substituent (F, Cl, CF₃) nevedie k aktívnym zlúčeninám⁵⁷
- poloha 5 alebo 6 pyrazínového kruhu je pre chloridový substituent výhodnejšia oproti polohe 3⁵⁷
- žiadna zreteľná závislosť medzi lipofilitou a antimykobakteriálnou aktivitou⁵⁵

Zhrnutie

Podľa ref. Servusová a kol.⁵⁸ *N*-fenyl-5-chlórpyrazín-2-karboxamidy vykazujú lepšiu aktivitu ako *N*-benzyl-5-chlórpyrazín-2-karboxamidy, teda

vsunutie -CH₂- mostíku vedie k zníženiu antimykobakteriálnej aktivity proti *M. tbc* H37Rv.

Na základe vypozerovaných znakov nie je možné zreteľne určiť vzťah lipofility k biologickej aktivite. U 6-alkylamino-*N*-fenzylpyrazín-2-karboxamidov so stúpajúcou lipofilitou sa zvyšovala aj aktivita, pričom maxima dosahovali heptylamino deriváty.⁵³ Lipofilita 5-chlór-*N*-fenzylpyrazín-2-karboxamidov nekorelovala s ich biologickou aktivitou.⁵¹

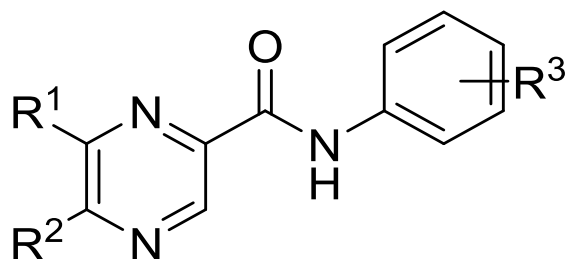
Výraznej antimykobakteriálnej aktivity bolo dosiahnuté substitúciou benzénového jadra halogenidovou alebo hydroxy skupinou.^{49,51} Podobné výsledky vykazovala substitúcia pyrazínového kruhu chloridovým atómom^{51,55} alebo alkylamínom^{52,53,56} v polohách 5 a/alebo 6.

Aktivity zlúčenín s najlepšou hodnotou MIC, budú zhrnuté v Tabuľke 1 a Tabuľke 2.

Tabuľka 1: *N*-fenyl-2-karboxamidové deriváty s najlepšimi hodnotami MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

R¹	R²	R³	Referencia	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
Cl	H	4-Cl	<i>Doležal a kol.</i>⁴⁹	6,25
Cl	H	3,4-Cl		6,25
H	H	3-CF ₃	<i>Doležal a kol.</i>⁵⁰	6,25
Cl	C(CH ₃)	3-CF ₃		6,25
H	Cl	H	<i>Zitko a kol.</i>⁵¹	3,13
H	Cl	2-OH		3,13
H	Cl	3-OH		6,25
H	Cl	4-OH		3,13
H	Cl	2,5-(CH ₃) ₂		1,56
H	Cl	4-C ₂ H ₅		1,56
H	Cl	4- <i>i</i> -Pr		1,56
H	Cl	2-F		6,25
H	Cl	3-F		6,25
H	Cl	2,4-F ₂		3,13
H	Cl	2-Cl		3,13
H	Cl	3-Cl		6,25
H	Cl	3,4-Cl ₂		3,13
H	Cl	4-Br		3,13
H	Cl	2-Cl-4-I		12,5
H	Cl	2-CH ₃ -5-F		3,13
H	Cl	2-Cl-5-CH ₃		1,56
H	Cl	5-Cl-2-OH		1,56
H	Cl	3-Cl-4-OH		3,13
H	Cl	2-OH-5-NO ₂		1,56
H	Cl	2-NO ₂		12,5
H	Cl	3-NO ₂		3,13
H	Cl	3-CF ₃		3,13
H	Cl	4-CF ₃		1,56
H	Cl	4-COOH-3-OH		3,13

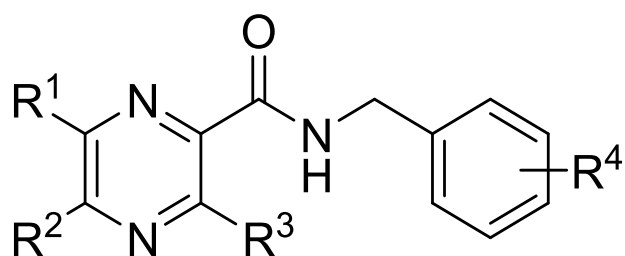
H	NH-propyl	H	Zitko a kol.⁵²	3,13
H	NH-butyl	H		1,56
H	NH-pentyl	H		3,13
H	NH-hexyl	H		0,78
H	NH-heptyl	H		0,78
H	NH-oktyl	H		3,13
H	NH-2-fenylethyl	H		12,5
H	NH-C ₅ H ₁₀ -OH	H		12,5
H	NH-heptyl	Cl		12,5
NH-propyl	H	H		Servusová-Vanasková a kol.⁵³
NH-butyl	H	H	6,25	
NH-pentyl	H	H	3,13	
NH-hexyl	H	H	1,56	
NH-heptyl	H	H	1,56	
NH-oktyl	H	H	3,13	
NH-pentyl	H	Cl	6,25	
NH-hexyl	H	Cl	6,25	
NH-heptyl	H	Cl	3,13	
NH-oktyl	H	Cl	6,25	



Tabuľka 2: *N*-benzylpyrazín-2-karboxamidové deriváty s najlepšimi hodnotami MIC

[$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]

R¹	R²	R³	R⁴	Referencia	MIC [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
Cl	H	–	4-OCH ₃	Servusová a kol.⁵⁵	6,25
Cl	C(CH ₃) ₃	–	3-CF ₃		6,25
Cl	C(CH ₃) ₃	–	4-OCH ₃		6,25
NH-butyl	H	–	H	Servusová- Vanasková a kol.⁵⁶	12,5
NH-pentyl	H	–	H		12,5
NH-hexyl	H	–	H		6,25
NH-heptyl	H	–	H		3,13
NH-oktyl	H	–	H		3,13
H	NH-pentyl	–	H		6,25
H	NH-hexyl	–	H		3,13
H	NH-heptyl	–	H		3,13
H	NH-oktyl	–	H		1,56
–	–	NH-benzyl- 2-CH ₃	2-CH ₃		Semelková a kol.⁵⁷
–	–	NH-benzyl- 3,4-Cl ₂	3,4-Cl ₂	12,5	



4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie, prístroje a analytické metódy

Chemikálie použité pri syntéze boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, German), pokiaľ nie je uvedené inak a boli použité v dodanej kvalite.

Rozpúšťadlá použité pri príprave predvolených a finálnych látok, konkrétne bezvodný toluén a bezvodný acetón boli riadne vyčistené a vysušené.

Všetky chemické vzorce, sumárne vzorce, výpočet molekulových hmotností boli prevádzané v programe ChemDraw Professional, verzia 17.1.0.105 (19) (PerkinElmer Informatics, Inc.). K zisteniu miery lipofility získaných zlúčenín boli vypočítané ich $\log P$ a $\text{Clog } P$ hodnoty pomocou programu ChemDraw Professional, verzia 17.1.0.105 (19) (PerkinElmer Informatics, Inc.). Výsledky hodnôt $\log P$ boli zaokrúhlené na dve desatinné miesta, a $\text{Clog } P$ hodnoty boli zaokrúhlené na tri desatinné miesta.

Pre sledovanie a kontrolu priebehu reakcií a taktiež k overeniu čistoty bola použitá metóda tenkovrstvej chromatografie (TLC). Ako mobilná fáza bola použitá sústava hexán-ethylacetát v pomere 1:1 pre látky JZ-JZ8 až JZ-JZ14 a pre látky JZ-JZ1 až JZ-JZ7 bol používaný pomer 1:3 s prídavkom 0,5 % (v/v) kyseliny octovej 99%. Vlastná analýza bola prevedená na TLC doskách Silica 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Nemecko). Detekcia výsledkov bola prevádzaná pod UV lampou emitujúcou žiarenie vlnovej dĺžky 254 nm.

Syntéza látok JZ8 až JZ13 bola realizovaná na mikrovlnom reaktore CEM Discover s fokusovaným poľom a autosamplérom Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA).

Novo nasyntetizované produkty boli separované pomocou chromatografu CombiFlash® Rf (Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA), kde ako stacionárna fáza slúžila kolóna ručne plnená silikagélom 60 (0.040–0.063 mm) a mobilné fáza bola tvorená hexánom-ethylacetátom v gradientovej elúcii, detekčná vlnová dĺžka bola 280 nm.

Teplota topenia výsledných čistých produktov bola meraná metódou v otvorenej kapiláre prístrojom Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Hodnoty sú nekorigované.

Totožnosť pripravených látok bola overovaná pomocou analýzy $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektier na Katedre organickej a bioorganickej chémie (KOBCH) Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy (FAF UK), doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. K meraniu bol použitý spektrometer Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA), pri frekvencii 500 MHz pre ^1H a 126 MHz pre ^{13}C . Spektrá boli zaznamenávané v deuterovanom dimethylsulfoxide ($\text{DMSO-}d_6$) alebo deuterovanom chloroforme (CDCl_3) pri laboratórnej teplote. Chemické posuny δ (ppm) sú vzťahnuté k tetramethylsilanu (TMS) a to nepriamo cez referenčné signály rozpúšťadla (pre DMSO 2,50 ppm v ^1H spektre a 39,70 ppm v ^{13}C spektre; pre CDCl_3 7,26 ppm v ^1H spektre a 77,0 v ^{13}C spektre).

Infračervené spektrá nasyntetizovaných látok boli zmerané na KOBCH, FAF UK pomocou prístroja Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) za použitia metódy ATR (zoslabený úplný odraz) na kryštále germánia.

Elementárna analýza bola prevedená za použitia analyzátoru Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Nemecko).

Praktické výťažky sa vzťahujú ku chromatograficky vyčistenému produktu.

4.2. Metódy syntéz

4.2.1. Metóda A – dvojstupňová syntéza

K príprave látok JZ-JZ1 až JZ-JZ7 bola použitá klasická metóda, pozostávajúca z dvoch krokov.

1.stupeň:

500 mg (3,15 mmol) kyseliny 5-chlórpyrazín-2-karboxylovej bolo dispergované v 50 ml bezvodného toluénu. Následne bolo pridané 1,5 ml thionylchloridu (20,6 mmol, 6,5 ekv.) a dve kvapky bezvodného *N,N*-dimethylformamidu (DMF), ktorý mal funkciu katalyzátora. Táto zmes bola zahrievaná na olejovej kúpeli pod spätným chladičom po dobu 1 hodiny pri 105 °C. Behom reakcie zmes tmavla a predvolená látka sa rozpúšťala. Po skončení reakcie sa zmes nechala vychladnúť. Potom nasledovalo oddestilovanie rozpúšťadiel za zníženého tlaku a zvyškov thionylchloridu opakovanou destiláciou s bezvodným toluénom. Bez ďalšieho čistenia bol produkt bezodkladne použitý do 2. kroku reakcie. Priebeh reakcie – vid' Schéma 2.

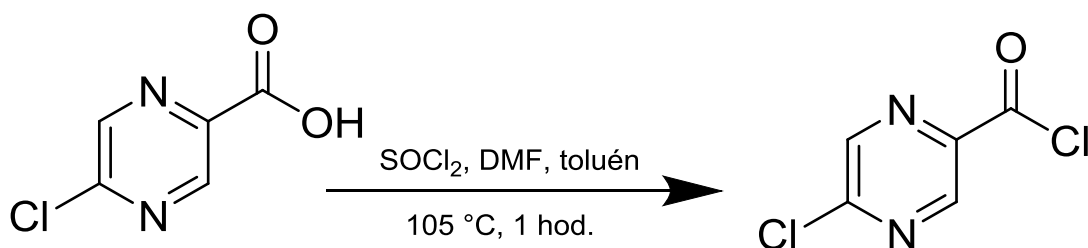


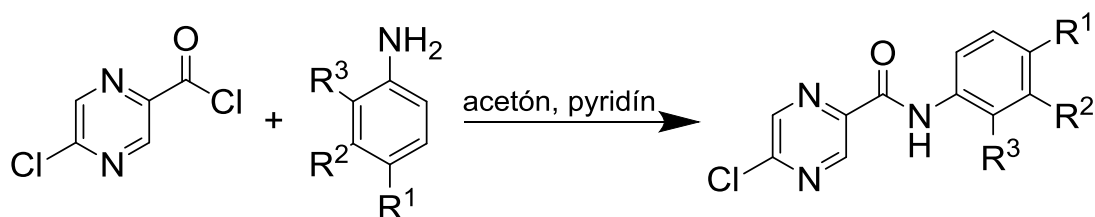
Schéma 2: Reakčná schéma prípravy chloridu kyseliny 5-chlórpyrazín-2-karboxylovej (5-Cl-POA)

2.stupeň:

Vzniknutý chlorid kyseliny 5-chlórpyrazín-2-karboxylovej bol rozpustený v 20 ml bezvodného acetónu a postupne po kvapkách pridávaný k roztoku, ktorý bol tvorený príslušnou substituovanou aminobenzoovou kyselinou (0,9 molárny ekvivalent voči predvolenej 5-Cl-

POA) a pyridínom (500 mg, 6,3 mmol, 2 ekv.) taktiež rozpustených a nariedených v bezvodnom acetóne. Počas pridávania acylchloridu kyseliny k reakčnej zmesi bola zmes chladená ľadom za postupného vypadávanía zrazeniny produktu. Vid' Schéma 3. Zmes bola miešaná asi 2 hodiny s kontrolou priebehu reakcie pomocou TLC a následne bola ponechaná na odstátie do druhého dňa.

Schéma 3: Obecný postup prípravy *N*-fenyl-5-chlórpyrazín-2-karboxamidových derivátov



R¹: -COOH, -OH

R²: -H, -OH, -Cl, -CH₃, -OCH₃, -COOH

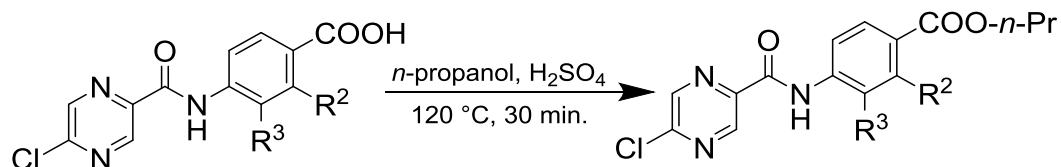
R³: -OH, -H

Kzmesi bolo pridané približne 10 g silikagélu zmiešaného s morským pieskom a rozpúšťadla boli oddestilované za zníženého tlaku. Prípadný zbytok pyridínu bol odstránený azeotropnou destiláciou s toluénom za zníženého tlaku. Naadsorbovaný suchý zbytok bol presunutý do flash chromatografu (silikagél, gradientová elúcia hexán-ethylacetát, detekčná vlnová dĺžka 280 nm). Frakcie obsahujúci cieľový produkt (po kontrole na TLC) boli spojené a prebytočné rozpúšťadlá oddestilované na vákuovej odparke. V prípade potreby bol produkt aditívne prečistený pomocou rekryštalizácie zo zmesi ethanol/voda. Tieto produkty boli tiež využité k príprave korešpondujúcich esterov (zlúčeniny JZ-JZ8 až JZ-JZ14).

4.2.2. Metóda B – mikrovlnami asistovaná syntéza (príprava esterov)

Do špeciálnej silnostennej skúmavky bolo pridané 200 mg resp. 300 mg (podľa výťažku z predchádzajúcej reakcie) príslušnej substituovanej 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamid) benzoovej kyseliny, 4 ml *n*-propanolu (nadbytok) a 1 kvapka koncentrovanej kyseliny sírovej (katalyzátor). Zmes bola opatrená miešadlom a skúmavka uzavretá viečkom bola uložená do automatického podávača mikrovlnného reaktoru (teplota 120 °C, 50 W, tlak 15 bar – bezpečnostná hranica, čas 30 minút). Priebeh reakcie - vid' Schéma 4. Po ukončení reakcie sa zmes zo skúmavky presunula do banky s guľatým dnom a zneutralizovaná 20% roztokom uhličitanu sodného. Prebytočné rozpúšťadla boli odparené do sucha na vákuovej odparke a pripravené k separácii pomocou flash chromatografie.

Schéma 4: Obecný postup prípravy esterových derivátov



R²: -H, -OH, -Cl, -CH₃, -OCH₃

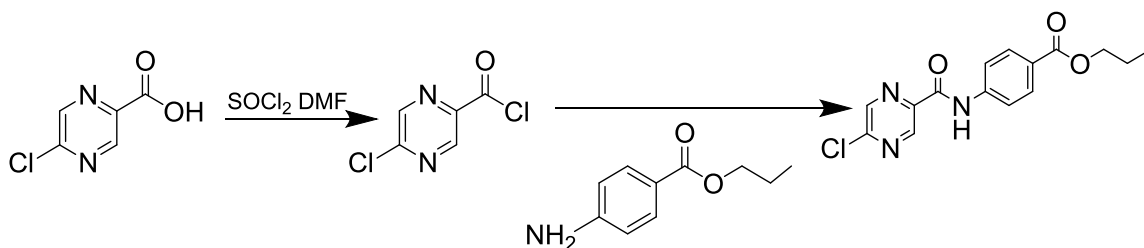
R³: -H, -OH

4.2.3. Metóda C

Je metódou spájajúcou Metódu A a Metódu B, pri nej dochádzalo rovno k vzniku esterov, bez použitia mikrovlnného reaktoru. Bola použitá u esterov JZ-JZ9 a JZ-JZ14.

495 mg (3,12 mmol) kyseliny 5-chlórpyrazín-2-karboxylovej bolo dispergované v bezvodnom toluéne, za následného pridania 1,5 ml SOCl_2 (20,6 mmol, 6,6 ekv.) a dvoch kvapiek katalyzátoru DMF. Táto zmes bola tiež zahrievaná pod spätným chladičom na olejovej kúpeli po dobu 1 hodiny pri 105 °C rovnako ako v Metóde A. Po vychladnutí bol produkt rozpustený v bezvodnom acetóne. Čo sa týka látky JZ-JZ14, tak k zmesi bol po kvapkách postupne pridávaný roztok pozostávajúci z 504 mg (0,9 ekv.) propyl-*p*-aminobenzoátu, 500 mg (6,2 mmol, 2 ekv.) pyridínu takisto rozpustené v bezvodnom acetóne. Priebeh reakcie – vid' Schéma 5. U derivátu JZ-JZ9 bol pridávaný roztok zložený z 498 mg (1 ekv.) methylesteru *p*-aminobenzoovej kyseliny, 500 mg (6,2 mmol, 2 ekv.) pyridínu takisto rozpustené v bezvodnom acetóne. Počas pridávania chloridu kyseliny k roztoku, bola táto zmes chladená ľadom a následne miešaná ešte 2 hodiny s kontrolou priebehu pomocou TLC. Ďalší priebeh je zhodný s Metódou A spomínanou vyššie.

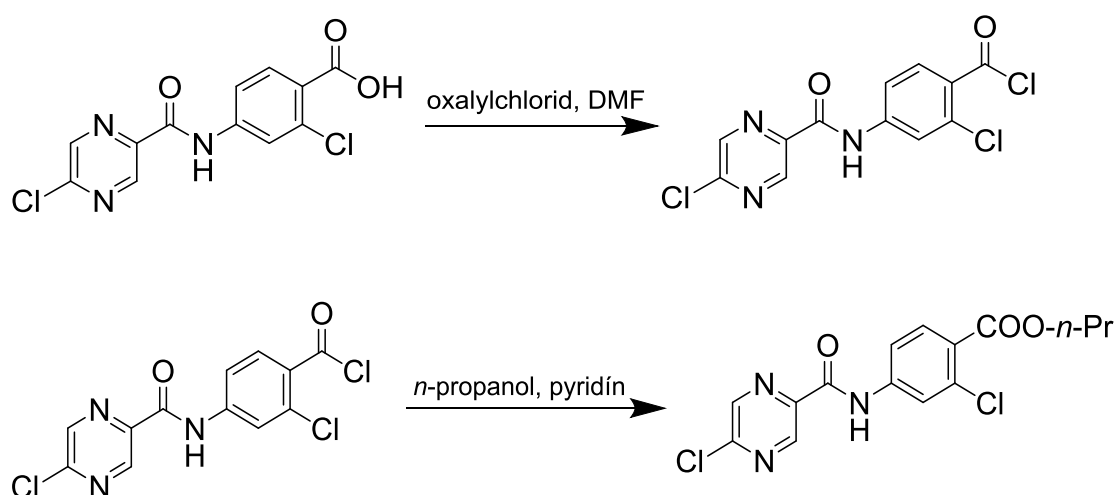
Schéma 5: Postup prípravy zlúčeniny JZ-JZ14



4.2.4. Metóda D

Posledná metóda bola využitá pri príprave zlúčeniny JZ-JZ13. 312 mg (1 mmol) 2-chlór-4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamid) benzoovej kyseliny (látka JZ-JZ2) bolo dispergované v bezvodnom acetóne (20 ml), s následným pridaním oxalylchloridu (152 mg, 1,2 mmol) a 1 kvapky DMF. Zmes bola zakrytá parafilmom a miešaná za laboratórnej teploty až do ukončenia vývoja bubliniek plynu (približne 30 minút) . Vzniknutý chlorid kyseliny bol zriedený bezvodným acetónom a postupne (behom 10 minút) za miešania pridávaný k roztoku *n*-propanolu (nadbytok, 10 ml) s pyridínom (10 mmol). Vid' Schéma 6. Reakčná zmes bola za kontroly TLC miešaná asi 2 hodiny. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes naadsorbovaná na silikagél a prečistená pomocou flash chromatografie.

Schéma 6: Postup prípravy látky JZ-JZ13



Finálne čisté produkty získané zo všetkých metód boli jednak charakterizované pomocou IR spektier, NMR spektier, teplotou topenia a ich čistota bola overená elementárnou analýzou. Taktiež u nich bola zisťovaná antimykobakteriálna, aditívne antibakteriálna a antifungálna aktivita.

4.3. Predvolené látky

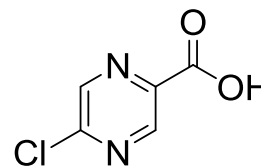
5-chlórpyrazín-2-karboxylová kyselina

Sumárny vzorec: $C_5H_3ClN_2O_2$

Molekulová hmotnosť: 158,54 g/mol

log *P*: 0,24

Clog *P*: 0,829



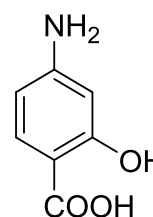
4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_7H_7NO_3$

Molekulová hmotnosť: 153,14 g/mol

log *P*: 0,40

Clog *P*: 1,056



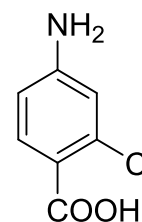
4-amino-2-chlórbenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_7H_6ClNO_2$

Molekulová hmotnosť: 171,58 g/mol

log *P*: 1,35

Clog *P*: 1,218



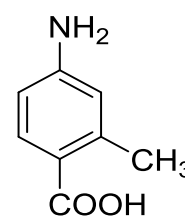
4-amino-2-methylbenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_8H_9NO_2$

Molekulová hmotnosť: 151,17 g/mol

log *P*: 1,28

Clog *P*: 1,177



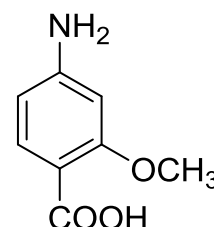
4-amino-2-methoxybenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_8H_9NO_3$

Molekulová hmotnosť: 167,16 g/mol

log *P*: 0,66

Clog *P*: 0,592



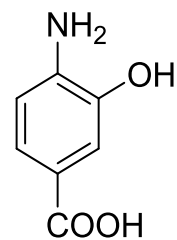
4-amino-3-hydroxybenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_7H_7NO_3$

Molekulová hmotnosť: 153,04 g/mol

log *P*: 0,40

Clog *P*: 0,796



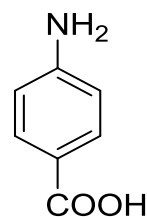
4-aminobenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_7H_7NO_2$

Molekulová hmotnosť: 137,14 g/mol

log *P*: 0,79

Clog *P*: 0,978



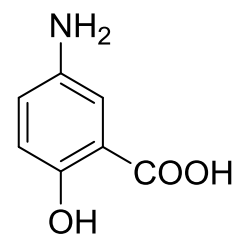
5-amino-2-hydroxybenzoová kyselina

Sumárny vzorec: $C_7H_7NO_3$

Molekulová hmotnosť: 153,14 g/mol

log *P*: 0,40

Clog *P*: 1,056



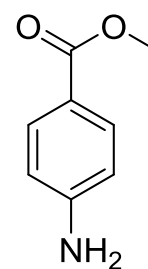
Methyl-4-aminobenzoát

Sumárny vzorec: $C_8H_9NO_2$

Molekulová hmotnosť: 151,16 g/mol

log *P*: 1,05

Clog *P*: 1,394



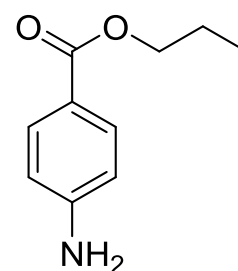
Propyl-4-aminobenzoát

Sumárny vzorec: $C_{10}H_{13}NO_2$

Molekulová hmotnosť: 179,22 g/mol

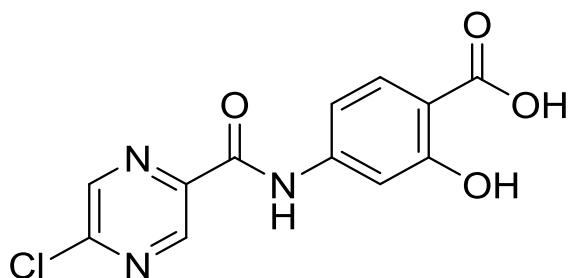
log *P*: 1,88

Clog *P*: 2,452



4.4. Novo pripravené látky – finálne produkty

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ1**

Sumárny vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 293,66 g/mol

Vzhľad: biela kryštalická látka

log *P*: 0,66

Clog *P*: 2,246

Teplota topenia: 267,9–269,1 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1183,4 mg

-praktická: 459 mg (38,78 %)

IR spektrum: 3389 v (OH, NH); 1695, 1646 v (C=O); 1587; 1521; 1456; 1305; 1240; 1133; 1022; 877; 783; 669

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.65 (bs, 1H, COOH)*, 11.37 (bs, 1H, OH)*, 10.93 (s, 1H, CONH), 9.11 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.92 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.76 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H6), 7.61 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H3), 7.46 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H, H5).

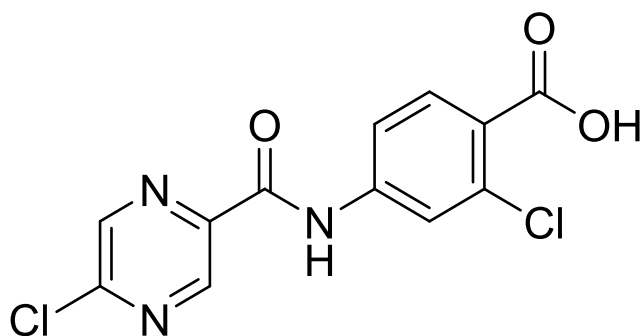
* veľmi široké, výmena s rozpúšťadlom

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.7, 162.0, 161.7, 151.3, 144.6, 144.4, 143.7, 143.1, 131.0, 111.7, 108.9, 107.7.

Elementárna analýza: vypočítaná C 49,09 %, H 2,75 %, N 14,31 %

nameraná C 49,67 %, H 2,73 %, N 14,21 %

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-chlórbenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ2**

Sumárny vzorec: C₁₂H₇Cl₂N₃O₃

Molekulová hmotnosť: 312,11 g/mol

Vzhľad: biela kryštalická látka

log *P*: 1,60

Clog *P*: 2,117

Teplota topenia: 236,6–237,9 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1242,2 mg

-praktická: 782 mg (62,95 %)

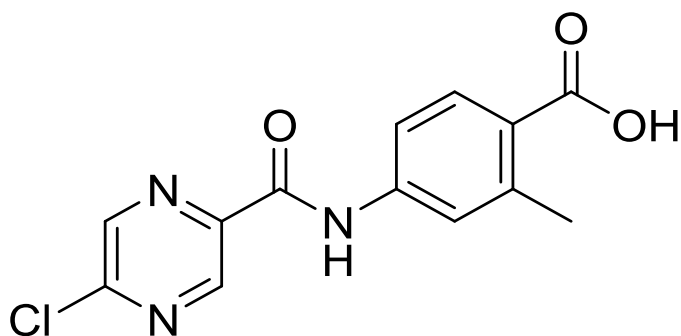
IR spektrum: 3356 v (OH, NH); 1698, 1677 v (C=O); 1573; 1514; 1384; 1297; 1269; 1228; 1130; 1022; 866; 775; 659

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.18 (bs, 1H, COOH), 11.13 (s, 1H, CONH), 9.12 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.94 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H6'), 8.17 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H3), 7.96 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, H5), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H6).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.1, 161.8, 151.4, 144.5, 143.5, 143.2, 141.9, 132.9, 132.3, 126.0, 121.9, 118.7.

Elementárna analýza: vypočítaná C 46,18 %, H 2,26 %, N 13,46 %
nameraná C 46,74 %, H 2,15 %, N 13,65 %

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-methylbenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ3**

Sumárny vzorec: C₁₃H₁₀ClN₃O₃

Molekulová hmotnosť: 291,69 g/mol

log *P*: 1,53

Clog *P*: 2,168

Teplota topenia: 255,1–257,2 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1283,4 mg

-praktická: 695 mg (54,17 %)

IR spektrum: 3356 v (OH, NH); 2975 v (CH); 1682, 1665 v (C=O); 1580; 1516; 1400; 1291; 1137; 1025; 835; 778; 663

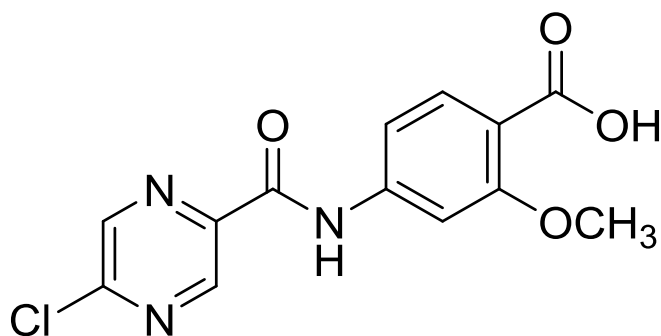
¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.64 (s, 1H, COOH), 10.85 (s, 1H, CONH), 9.11 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.93 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H6'), 7.89–7.78 (m, 3H, H3, H5, H6), 2.53 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.2, 161.4, 151.3, 144.3, 143.8, 143.1, 141.2, 140.6, 131.6, 125.8, 123.0, 117.6, 22.0.

Elementárna analýza: vypočítaná C 53,53 %, H 3,46 %, N 14,41 %

nameraná C 53,91 %, H 3,35 %, N 14,47 %

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-methoxybenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ4**

Sumárny vzorec: C₁₃H₁₀ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 307,69 g/mol

log *P*: 0,92

Clog *P*: 1,526

Teplota topenia: 234,4–236,3 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1372,3 mg

-praktická: 563 mg (40,99 %)

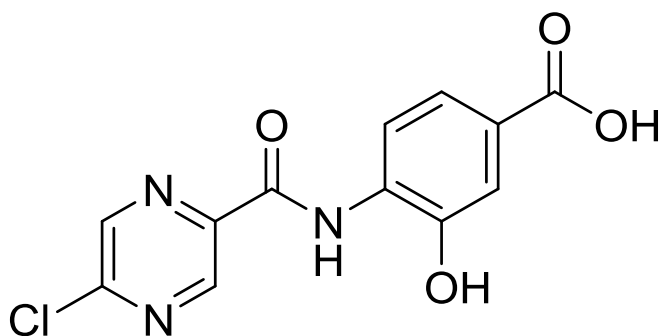
IR spektrum: 3282, 3079 v (OH, NH); 1746, 1683 v (C=O); 1594; 1526; 1422; 1285; 1255; 1137; 1021; 855; 770; 670

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.38 (bs, 1H, COOH), 10.92 (s, 1H, CONH), 9.13 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.94 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H3), 7.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H6), 7.62 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H, H5), 3.82 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.6, 161.5, 159.3, 151.3, 144.3, 143.7, 143.1, 142.9, 132.2, 116.3, 111.7, 104.4, 55.8.

Elementárna analýza: vypočítaná C 50,75 %, H 3,28 %, N 13,66 %
nameraná C 51,32 %, H 3,28 %, N 13,45 %

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-3-hydroxybenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ5**

Sumárny vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 293,66 g/mol

log *P*: 0,66

Clog *P*: 1,846

Teplota topenia: 289,0–290,7 °C

Výťažnosť reakcie: - teoretická: 1306,8 mg

-praktická: 514 mg (39,33 %)

IR spektrum: 3370, 3011 v (OH, NH); 1687 v (C=O); 1606; 1531; 1456; 1317; 1280; 1222; 1124; 1012; 894; 770; 687

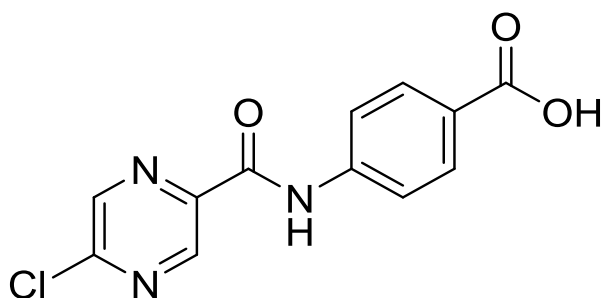
¹H NMR: (500 MHz, DMSO- *d*₆) δ 12.75 (bs, 1H, COOH), 10.82 (bs, 1H, OH), 10.20 (s, 1H, CONH), 9.13 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.95 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H6'), 8.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H5), 7.53–7.47 (m, 2H, H3, H6).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.1, 159.9, 151.6, 146.4, 143.8, 143.5, 142.8, 129.8, 126.7, 121.4, 118.6, 115.3.

Elementárna analýza: vypočítaná C 49,08 %, H 2,75 %, N 14,31 %

nameraná C 47,50 %, H 3,59 %, N 11,48 %

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-benzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ6 R**

Sumárny vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₃

Molekulová hmotnosť: 277,66 g/mol

Vzhľad: biela pevná látka

log *P*: 1,05

Clog *P*: 1,969

Teplota topenia: 291,3–293,8 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1012,3 mg

-praktická: 436 mg (43,07 %)

IR spektrum: 3352 v (OH, NH); 1683 v (C=O); 1591; 1518; 1410; 1297; 1183; 1140; 1026; 858; 772; 675

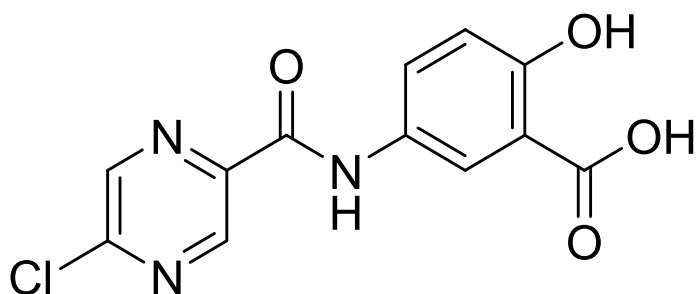
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.75 (bs, 1H, COOH), 11.02 (s, 1H, CONH), 9.13 (s, 1H, H3'), 8.95 (s, 1H, H6'), 8.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ArH).

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

Elementárna analýza: vypočítaná C 51,91 %, H 2,90 %, N 15,13 %

nameraná C 51,30 %, H 3,11 %, N 14,71 %

5-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Označenie: **JZ-JZ7**

Sumárny vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 293,66 g/mol

Vzhľad: žltá/okrová pevná látka

log *P*: 0,66

Clog *P*: 2,246

Teplota topenia: >300 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 1289,2 mg

-praktická: 19 mg (14,74 %)

IR spektrum: 3357, 3080 v (OH, NH); 1698, 1683 v (C=O); 1575; 1516; 1385; 1296; 1268; 1228; 1131; 1022; 775; 659

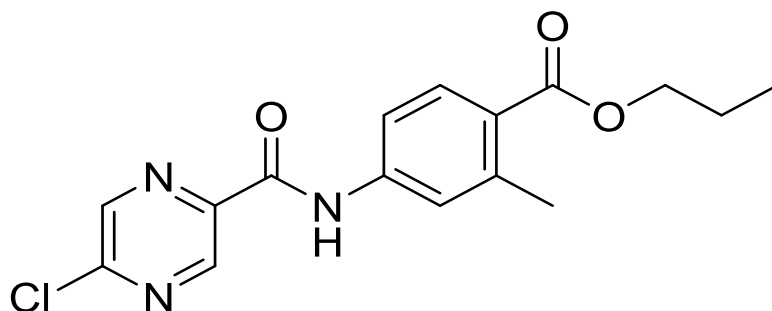
¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.63 (s, 1H, CONH), 9.08 (s, 1H, H3'), 8.90 (s, 1H, H6'), 8.32 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H6), 7.77 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H, H4), 6.83 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H3).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.1, 160.6, 158.8, 150.9, 144.2, 144.0, 143.1, 128.8, 127.5, 122.9, 116.6, 115.9.

Elementárna analýza: vypočítaná C 49,08 %, H 2,75 %, N 14,31 %

nameraná C 48,44 %, H 2,51 %, N 13,46 %

Propyl 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-methylbenzoát



Označenie: **JZ-JZ8**

Sumárny vzorec: C₁₆H₁₆ClN₃O₃

Molekulová hmotnosť: 333,77 g/mol

Vzhľad: biela pevná látka

log *P*: 2,62

Clog *P*: 3,774

Teplota topenia: 123,5–124,8 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 460,6 mg

-praktická: 71 mg (15,41 %)

IR spektrum: 3328 v (OH, NH); 2973 v (CH); 1716, 1674 v (C=O); 1586; 1532; 1279; 1258; 1233; 1139; 1081; 1025; 849; 780; 696

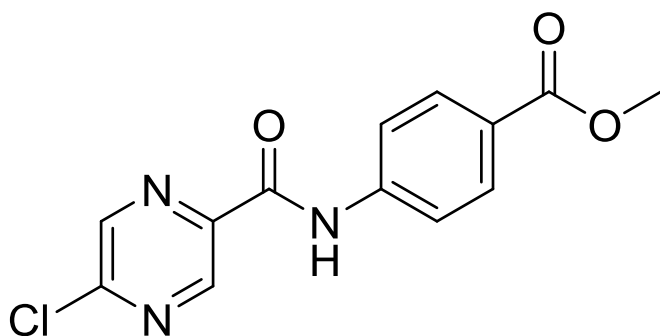
¹H NMR: NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.88 (s, 1H, CONH), 9.10 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.93 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6'), 7.89–7.82 (m, 3H, H3, H5, H6), 4.18 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 2.53 (s, 3H, ArCH₃), 1.76–1.66 (m, 2H, CH₂), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.4, 161.4, 151.3, 144.3, 143.7, 143.1, 141.5, 140.5, 131.4, 125.0, 123.0, 117.7, 66.0, 21.9, 21.8, 10.7.

Elementárna analýza: vypočítaná C 57,58 %, H 4,83 %, N 12,59 %

nameraná C 57,39 %, H 4,57 %, N 12,46 %

Methyl 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-benzoát



Označenie: **JZ-JZ9**

Sumárny vzorec: $C_{13}H_{10}ClN_3O_3$

Molekulová hmotnosť: 291,69 g/mol

Vzhľad: šedobiela pevná látka

log P: 1,31

Clog P: 2,217

Teplota topenia: 228,8–231,3 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 345,3 mg

-praktická: 79 mg (22,88 %)

IR spektrum: 3352 v (OH, NH); 2956 v (CH); 1716, 1682 v (C=O); 1532; 1410; 1279; 1140; 1023; 860; 788; 667

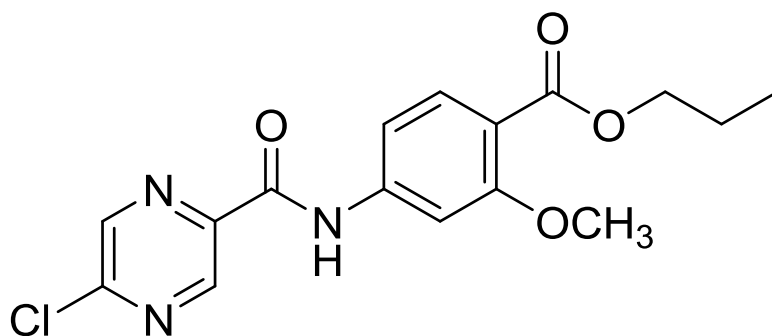
1H NMR: (500 MHz, DMSO- d_6 /pyridine- d_5 1:1) δ 10.88 (s, 1H, CONH), 9.22 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.83 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H6'), 8.20–8.13 (m, 2H, AA', BB', H3, H5), 8.10–8.04 (m, 2H, AA', BB', H2, H6), 3.85 (s, 3H, OCH3).

^{13}C NMR: (126 MHz, DMSO- d_6 /pyridine- d_5 1:1) δ 165.7, 161.0, 151.2, 143.9, 143.4, 142.5, 142.2, 129.9, 125.5, 119.9, 51.3.

Elementárna analýza: vypočítaná C 53,53 %, H 3,46 %, N 14,41 %

nameraná C 53,86 %, H 3,40 %, N 14,41 %

Propyl 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-methoxybenzoát



Označenie: **JZ-JZ11**

Sumárny vzorec: C₁₆H₁₆ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 349,77 g/mol

Vzhľad: žltá jemne kryštalická látka

log *P*: 2,01

Clog *P*: 3,033

Teplota topenia: 137,1–138,8 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 341,0 mg

-praktická: 95 mg (27,86 %)

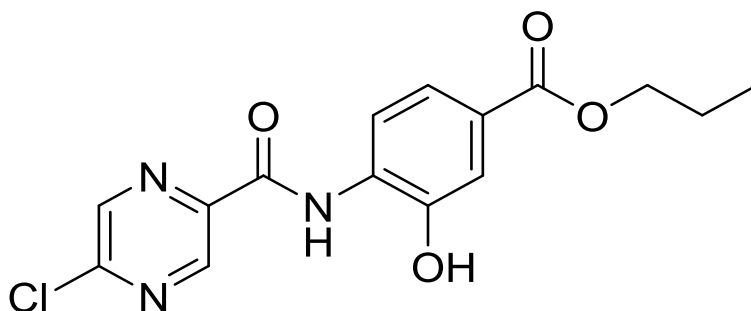
IR spektrum: 3352 v (OH, NH); 2974 v (CH); 1683 v (C=O); 1589; 1526; 1292; 1132; 1025; 859; 777; 673

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.94 (s, 1H, CONH), 9.12 (s, 1H, H3'), 8.93 (s, 1H, H6'), 7.79 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H3), 7.70 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H6), 7.64 (dd, J = 8.5, 1.8 Hz, 1H, H5), 4.14 (t, J = 6.5 Hz, OCH₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 1.67 (h, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 161.5, 159.3, 151.4, 144.4, 143.7, 143.2, 143.1, 132.0, 115.5, 111.7, 104.5, 65.8, 55.9, 21.8, 10.6.

Elementárna analýza: vypočítaná C 54,94 %, H 4,61 %, N 12,01 %
nameraná C 54,54 %, H 4,36 %, N 11,75 %

Propyl 4-(chlórpyrazín-2-karboxamido)-3-hydroxybenzoát



Označenie: **JZ-JZ12**

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₄ClN₃O₄

Molekulová hmotnosť: 335,74 g/mol

Vzhľad: šedobiela pevná látka

log P: 1,74

Clog P: 3,338

Teplota topenia: 203,3–207,9 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 228,3 mg

-praktická: 64 mg (28,03 %)

IR spektrum: 3320 v (OH, NH); 2973 v (CH); 1712, 1673 v (C=O); 1543; 1428; 1317; 1226; 1111; 1022; 906; 764; 700

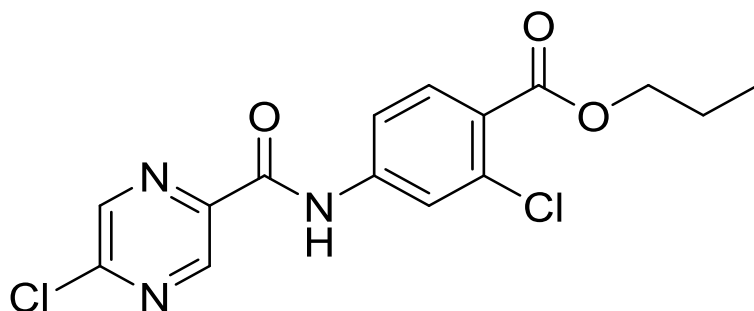
¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.87 (bs, 1H, OH), 10.18 (s, 1H, CONH), 9.11 (s, 1H, H3'), 8.94 (s, 1H, H6'), 8.42 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H5), 7.57–7.44 (m, 2H, H3, H6), 4.18 (t, J = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 1.76–1.65 (m, 2H, CH₂), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.5, 159.9, 151.6, 146.5, 143.8, 143.4, 142.7, 130.2, 125.7, 121.2, 118.6, 115.0, 66.2, 21.8, 10.6.

Elementárna analýza: vypočítaná C 53,66 %, H 4,20 %, N 12,52 %

nameraná C 54,22 %, H 4,16 %, N 12,42 %

Propyl 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-chlorobenzoát



Označenie: **JZ-JZ13**

Sumárny vzore: C₁₅H₁₃Cl₂N₃O₃

Molekulová hmotnosť: 354,19 g/mol

Vzhľad: biela pevná látka

log *P*: 2,69

Clog *P*: 3,553

Teplota topenia: 102,6–106,0 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 354,2 mg

-praktická: 78,1 mg (22,04 %)

IR spektrum: 3359 v (OH, NH); 2970 v (CH); 1687 v (C=O); 1579; 1517; 1312; 1287; 1132; 1026; 888; 775; 665

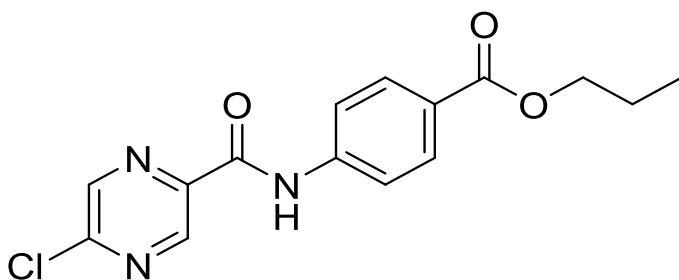
¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 9.61 (s, 1H, CONH), 9.27 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H3'), 8.59 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H6'), 7.95–7.92 (m, 2H, H3, H6), 7.70 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, H5), 4.30 (t, J = 6.6 Hz, 2H, OCH₂), 1.87–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 165.0, 160.1, 152.9, 144.3, 142.5, 141.9, 140.5, 135.2, 132.8, 126.0, 121.6, 117.3, 67.1, 22.0, 10.6.

Elementárna analýza: vypočítaná C 50,87 %, H 3,70 %, N 11,86 %

nameraná C 51,21 %, H 3,58 %, N 11,83 %

Propyl 4-(5 chlórpyrazín-2-karboxamido)-benzoát



Označenie: **JZ-JZ14**

Sumárny vzorec: C₁₅H₁₄ClN₃O₃

Molekulová hmotnosť: 319,75 g/mol

Vzhľad: biele až mliečne šupinaté kryštály

log *P*: 2,13

Clog *P*: 3,275

Teplota topenia: 167,2–168,4 °C

Výťažnosť reakcie: -teoretická: 997,6 mg

-praktická: 202 mg (20,24 %)

IR spektrum: 3354 v (OH, NH); 2972 v (CH); 1705, 1686 v (C=O); 1533; 1316; 1274; 1123; 1022; 853; 770; 666

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 9.64 (s, 1H, CONH), 9.28 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.59 (d, J = 1.4 Hz, 1H, H6'), 8.16–8.02 (m, 2H, AA', BB', H3, H5) 7.90–7.75 (m, 2H, AA', BB', H2, H6), 4.29 (t, J = 6.7 Hz, 2H, OCH₂), 1.88–1.73 (m, 2H, CH₂), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 166.0, 160.0, 152.7, 144.3, 142.4, 142.2, 140.9, 130.9, 126.8, 119.1, 66.5, 22.1, 10.5.

Elementárna analýza: vypočítaná C 56,35 %, H 4,41 %, N 13,14 %
nameraná C 56,76 %, 4,27 %, N 13,29 %

4.5. Výsledky biologického hodnotenia

4.5.1. Antibakteriálna aktivita

Účinnosť na baktérie bola skúšaná na Katedre biologických s lekárskych vied (KBLV) FAF UK.

Testované baktérie (Tabuľka 4) boli suspendované v 0,85% roztoku NaCl. Po úprave vznikla suspenzia hustoty ekvivalentnej 0,5 McFarlandovej stupnice ($1,5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹). Testované zlúčeniny boli rozpustené v dimethylsulfoxide (DMSO) a neriedené pôdou (látky boli ťažko rozpustné). Testovalo sa mikrodilučnou bujónovou metódou v doštičkách (200 µl média + 10 µl suspenzie inokula). Ako médium bol použitý Mueller-Hintonov bujón č. 2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulácia prebiehala 24–48 hodín pri 35 °C, staticky, bez prístupu svetla, v humidnej atmosfére.

Vyhodnotenie prebiehalo vizuálne.

Ani jedna z testovaných látok v stanovených koncentráciách nevykazovala na testované kmene baktérii aktivitu. Maximálne koncentrácie skúšaných látok v jamkách mikrotitračnej doštičky boli 500 µmol.l⁻¹ pre JZ-JZ1, JZ-JZ2, JZ-JZ3, JZ-JZ4, JZ-JZ5, JZ-JZ7, JZ-JZ8, JZ-JZ11, JZ-JZ12, JZ-JZ13 a 125 µl⁻¹ pre látky JZ-JZ9 a JZ-JZ14.

Tabuľka 4: Testované kmene baktérií a použité štandardy pri testovaní

Testované kmene + kód, lab. číslo	Štandardy (po 48 hod.) MIC/IC ₉₅ [µmol.l ⁻¹]	
	Gentamicín	Ciprofloxacín
SA- <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, CCM 4223 lab.ID 142-2016	1	0,25
EF- <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, CCM 4224 lab.ID 164-2016	8	0,25
EC- <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, CCM 3954 lab.ID 162-2016	1	0,004
PA- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, CCM 3955 lab.ID 163-2016	0,25	0,062

4.5.2. Antifungálna aktivita

Stanovenie aktivity zlúčenín voči hubovým kmeňom bolo prevádzané na KBLV, FAF UK.

Kmene húb sú uvedené v Tabuľke 5.

Zlúčeniny boli rozpustené v DMSO. Testovanie prebiehalo mikrodilučnou bujónovou metódou na doštičkách (200 μ l média + 10 μ l suspenzie inokula), pri teplote 35 °C , pH / pufer 7,0 / MOPS (0,165 M) v médiu RPMI 1640 s glutamínom a 2% glukózou. Inkubácia prebiehala staticky, v tme, v humidnej atmosfére po dobu 24–48 hodín. Hustota inokulačnej suspenzie bola 0,5–2x10³ CFU.ml⁻¹. K porovnaniu bol použitý štandard antimykotikum Amfotericín B. Po vizuálnom odčítaní sa výsledky vyjadrili ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC), ktorá je charakterizovaná ako minimálna koncentrácia látky, ktorá inhibuje rast mikroorganizmov.

Ani jedna z testovaných zlúčenín v stanovených koncentráciách nevykazovala antifungálnu aktivitu. Maximálna koncentrácia skúšaných látok v jamkách mikrotitračnej doštičky boli 500 μ mol.l⁻¹ (pre JZ-JZ1, JZ-JZ2, JZ-JZ3, JZ-JZ4, JZ-JZ5, JZ-JZ7, JZ-JZ8, JZ-JZ11, JZ-JZ13) a 125 μ mol.l⁻¹ pre látky JZ-JZ9, JZ-JZ12, JZ-JZ14.

Tabuľka 5: Testované kmene húb a použitý štandard pri testovaní

Testované kmene + kód, lab. číslo	Standard (po 48 hod.) MIC [μ mol.l ⁻¹]
CA1 - <i>Candida albicans</i> ATCC 24433, CCM 8320 lab.ID 166-2016	Amfotericín B 0,25
CK - <i>Candida krusei</i> ATCC 6258, CCM 8271 lab.ID 169-2016	1
AF - <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305 lab.ID 169-2017	1
AC - <i>Absidia corymbifera</i> CCM 8077 lab.ID 173-2017	1

4.5.3. Antimykobakteriálna aktivita

Všetkých 13 látok bolo testovaných *in vitro* na účinnosť proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* Haunduroy CNCTC My 235/80 (ATCC 12478), *Mycobacterium avium* ssp. *avium* Chester CNCTC My 80/72 (ATCC 15769), *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366).

Kmene *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium* boli získané z České Národní Sbírký Typových Kultur (CNCTC), Národní Institut Veřejného zdraví, Praha. Kmene *M. smegmatis* a *M. aurum* boli zakúpené z Nemeckej kolekcie mikroorganizmov a bunčných kultúr (Braunschweig, Germany).

Antimykobakteriálna aktivita proti *M. tbc*, *M. kansasii*, *M. avium*:

Antimykobakteriálna aktivita bola testovaná vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Rastové médium tvoril bujón Middlebrook 7H9 s rastovým doplnkom AODC (albumín, kyselina olejová, dextróza a kataláza), dodané firmou Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Médium malo deklarovanú hodnotu pH 6,6. K pozitívnej kontrole inhibície rastu bol použitý isoniazid (INH), negatívnu kontrolu rastu mykobaktérií poskytla živná pôda s DMSO. Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO a nariadené dvojkovým riedením. Koncentrácie skúšaných látok v jamkách mikrotitračnej doštičky boli 100 – 50 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledná koncentrácia DMSO v jamkách neprekročila 1 % (v/v) a neovplyvňovala rast mykobaktérií. Po uplynutí doby päť dní bol pridaný roztok Almar Blue. Následne boli odčítané výsledky a stanovená MIC v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MIC je definovaná ako vizuálne zistená najnižšia koncentrácia testovanej látky, ktorá zabránila zmene modrého sfarbenia na ružové. Test bol prevádzaný v duplikáte.

Antimykobakteriálna aktivita proti *M. smegmatis*, *M. aurum*:

Antimykobakteriálna aktivita bola skúmaná mikrodilučnou bujónovou doštičkovou metódou. Ako rastové médium bol použitý bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) obohatený 0,4% glycerolom (SigmaAldrich, Steinheim, Germany) a 10% Middlebrook OADC rastovými doplnkami (Himedia, Mumbai, India).

Mykobakteriálne kmene boli kultivované na agare Middlebrook 7H9 a suspenzie boli pripravené v bujóne Middlebrook 7H9. Výsledná hustota bola nastavená rozmedziu hodnôt od 0,5 do 1,0 podľa McFarlandovej stupnice a riedená bujónom v pomere 1:20. Testované zlúčeniny boli rozpustené v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) potom bol pridaný Middlebrook bujón k nadobudnutiu koncentrácie 2000 $\mu\text{l.ml}^{-1}$. Štandardy používané pre determináciu aktivity boli isoniazid (INH), rifampicín (RIF) a ciprofloxacín (CPX) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Výsledné koncentrácie boli dosiahnuté dvojkovým riedením a pridaním mykobakteriálnej suspenzie a boli nastavené ako 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ okrem štandardu rifampicínu, kde výsledné koncentrácie boli 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 a 0,098 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, a ciprofloxacín, kde výsledné koncentrácie boli 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156, 0,0078 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Finálna koncentrácia DMSO nepresiahla 2,5% (v/v) a neovplyvňovala rast *M. smegmatis* a *M. aurum*. Zahnuté boli pozitívne (bujón, DMSO, baktéria) a negatívne (bujón, DMSO) kontroly.

Doštičky boli uzavreté polyesterovou adhezívnou fóliou a inkubované v tme pri 37 °C bez trepania. Po 48 hodinovej inkubácii u *M. smagmatis*, resp. po 72 hodinovej inkubácii u *M. aurum* nasledovalo pridanie 0,01% roztoku sódnej soli rezaurinu. Potom bol pridaný 10% vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Mikrotitračné doštičky boli inkubované na ďalších 2,5 hodín pre stanovenie aktivity proti *M. smagmatis*, resp. 4 hodiny pre *M. aurum*.

Antimykobakteriálna aktivita bola vyjadrená ako MIC v $\mu\text{l.ml}^{-1}$ a hodnota bola vizuálne odčítaná na základe zmeny farby (modrá - aktívna

zlúčenina a ružová – neaktívna). MIC hodnoty pre štandardy boli v rozmedzí 7,81–15,625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre INH 12,5–25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre RIF a 0,0625–0,125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre CPX proti *M. smagmatis*, resp. 1,95–3,91 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre INH, 0,78–1,56 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre RIF a 0,00781–0,1563 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pre CPX proti *M. aurum*. Všetky experimenty boli prevádzané duplikovane.

Tabuľka 6: Antimykobakteriálna aktivita novo pripravených látok vyjadrená v MIC [$\mu\text{g.ml}^{-1}$] v porovnaní so štandardmi

zlúčeniny				MIC [$\mu\text{g.ml}^{-1}$]				
kód	R ¹	R ²	R ³	<i>M. tbc</i> H37Rv	<i>M. kansasii</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>
JZ-JZ1	COOH	OH	H	6,25	>100	>100	125	n.a
JZ-JZ2	COOH	Cl	H	50	>100	>100	250	n.a
JZ-JZ3	COOH	CH ₃	H	>100	>100	>100	>500	n.a
JZ-JZ4	COOH	OCH ₃	H	>100	>100	>100	62,5	n.a
JZ-JZ5	COOH	H	OH	>100	>100	>100	>250	n.a
JZ-JZ6 R	COOH	H	H	>50	>50	>50	>250	125
JZ-JZ7	OH	COOH	H	12,5	>100	>100	>500	n.a
JZ-JZ8	COOPr	CH ₃	H	>100	>100	>100	>500	>500
JZ-JZ9	COOMe	H	H	>100	>100	>100	n.a	n.a
JZ-JZ11	COOPr	OCH ₃	H	>100	>100	>100	>500	>500
JZ-JZ12	COOPr	H	OH	6,25	>100	>100	>500	>500
JZ-JZ13	COOPr	Cl	H	n.a	n.a	n.a	>500	>500
JZ-JZ14	COOPr	H	H	>100	n.a	>100	n.a.	n.a
INH	-	-	-	0,2	6,25–12,5	12,5	15,625	1,95–3,91
RIF	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	0,19–0,39	0,78–1,56
CPX	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	0,098	0,00781–0,1563

INH- isoniazid, RIF- rifampicín, CPX- ciprofloxacín, n.t.- netestované,
n.a.– nedostupné (not available)

4.5.4. *In vitro* cytotoxicita na HepG2 bunečnej línii

Vybrané finálne zlúčeniny zaujímavé z hľadiska ich antimykobakteriálnej aktivity či štruktúry boli testované na *in vitro* cytotoxicitu voči HepG2 bunečnej línii.

Bunečná línia ľudských pečňových buniek HepG2 poriadená z Health Protection Agency Culture Collection (ECACC, Salisbury, UK), bola kultivovaná v médiu Minimum Essentials Eagle Medium (MEM, Sigma-Aldrich) doplnenom 10 % fetálnym bovinným sérom (Půů, Biotech, Praha), 1 % roztokom L-glutamínu (Sigma-Aldrich) a roztokom neesenciálnych mastných kyselín (Sigma-Aldrich). Všetko prebiehalo v humidnej 5 % CO₂ atmosfére pri teplote 37 °C. Bunky získané po úprave v roztoku trypsín/EDTA (Sigma-Aldrich) pri teplote 37 °C a potom naďalej upravené testovanými látkami boli použité ako experimentálne skupiny. Bunky HepG2 bez nanesení testovaných látok boli použité ako skupiny kontrolné.

Bunky boli nasadené v hustote 1x10⁴ buniek na jamku do 96-jamkovej titračnej doštičky. Ďalší deň boli k bunkám pridané upravené testované látky rozpustené v DMSO. Testované zlúčeniny boli pre inkubáciu pripravené v koncentráciách 0-100 μM (v desiatich rôznych koncentráciách) v triplikátoch pre každú koncentráciu. Zároveň bola pripravená kontrola pre stanovenie 100 % viability, kontrola pre stanovenie nulovej viability (pôsobením 10 % DMSO), kontrola bezbunečného obsahu a kontrola vehikula. Po 24 hodinách inkubácie v humidnej 5% CO₂ atmosfére bol pridaný reagens použitého kitu (CellTiter 96). Po ďalších 2 hodinách inkubácie v humidnej 5 % CO₂

atmosfére pri 37 °C bola pomocou doštičkového analyzátoru (TECAN, Infinita M2000, Austria) zaznamenaná absorbanca pri vlnové dĺžke 490 nm. Štandardný toxikologický parameter IC 50 bol vypočítaný pomocou programu GraphPad Prism 7 software.

Tabuľka 7: *In vitro* cytotoxicita vybraných zlúčenín na HepG2 bunecnej línie a ich index selektivity (SI)

Zlúčenina				HepG2 cytotoxicita		Aktivita	
kód	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ [μM]	Testované koncentrácie [μM]	MIC [μM]	SI = IC ₅₀ / MIC
JZ-JZ1	COOH	OH	H	159.80	1–1000	21,3 MT	7,50
JZ-JZ2	COOH	Cl	H	286.00	1–1000	160,2 MT	1,78
JZ-JZ4	COOH	OCH ₃	H	301.10	1–1000	203,1 MK	1,48
JZ-JZ7	OH	COOH	H	601.50	1–1000	42,6 MT	14,12
JZ-JZ12	COOPr	H	OH	6.64	1–1000	18,6 MT	0,36
JZ-JZ13	COOPr	Cl	H	20.60	1–1000	Neaktívna	-

MT – *Mycobacterium tuberculosis*, MK – *Mycobacterium kansasii*

Z hľadiska budúceho vývoja je možné za perspektívne zlúčeniny považovať tie, ktorých index selektivity (SI) je vyšší alebo rovný desať. Zaujímavý je fakt, že estery kyselín vykázali radovo 10x vyššiu cytotoxicitu ako karboxylové kyseliny. Dokumentovať to ide na dvojici JZ-JZ2 (IC₅₀ = 286.00 μM) a JZ-JZ13 (IC₅₀ = 20,60 μM).

Z uvedených výsledkov *in vitro* cytotoxicity vyplýva, že najslubnejšia zlúčenina, majúca nízku toxicitu a zároveň selektívnu antimykobakteriálnu aktivitu (*M. tbc* H37Rv) je zlúčenina JZ-JZ7 (SI= 14,12 MIC *M. tbc* H37Rv 12.5 μg.ml⁻¹).

5. DISKUSIA

Pre celkové zhodnotenie obdržaných výsledkov budú naďalej pripravené zlúčeniny rozdelené na dve skupiny a to na karboxy a propylester deriváty.

K príprave zlúčenín boli celkovo použité štyri rôzne metódy.

Prvá metóda (A) predstavovala dvojstupňová syntézu, kde prvý stupeň spočíval v príprave chloridu kyseliny 5-chlórpyrazín-2-karboxylovej. V druhom stupni sa 5-chlórpyrazínoyl chlorid nechal zreagovať so substituovanou aminobenzoovou kyselinou v prítomnosti pyridínu a acetónu, za vzniku príslušného *N*-fenyl-5-chlórpyrazín-2-karboxamidového derivátu.

Druhá metóda (B) bola realizovaná pomocou využitia mikrovlnného reaktoru a boli ňou nasyntetizované látky charakteru esterov. Ako predvolené látky boli použité produkty získané metódou A, ku ktorým bol pridaný príslušný alkohol a kyselina sírová.

Tretia (C) a štvrtá (D) metóda predstavovali zjednodušené predchádzajúce metódy.

Výťažky reakcií karboxy derivátov sa pohybovali v rozmedzí 14,74 % až 62,95 %, pričom priemerná hodnota bola 42,86 %, zatiaľ čo výťažky esterových derivátov boli v rozmedzí 15,41–28,03 %, pričom priemerná hodnota bola 22,74 %. Množstvo výťažku je vysvetliteľné stratami behom čistiacieho procesu (flash chromatografia, rekryštalizácia). Látky boli charakterizované pomocou TLC, NMR, IR spektier a elementárnej analýzy. Teplota topenia bola tiež stanovená.

Lipofilita látok bola charakterizovaná pomocou hodnôt $\log P$ a $\text{Clog } P$, vypočítané v programe ChemDraw. Hodnoty $\log P$ karboxy derivátov sa pohybovali od 0,66 do 1,60. Hodnoty $\text{Clog } P$ boli v rozmedzí 1,53–2,23. Esterové deriváty vykazovali hodnoty $\log P$ v rozmedzí 1,74 až 2,69.

Hodnoty Clog *P* týchto derivátov boli od 2,22 do 3,77. Z týchto hodnôt je patrné, že lipofilita pripravovaných látok sa zvýšila pri vytvorení propylesteru príslušných derivátov.

Látky boli odoslané na antimykobakteriálne, antifungálne a antibakteriálne testovanie. Je však nutné brať v úvahu nedostatočné vyčistenie látky JZ-JZ5, jej aktivitu tým pádom nemožno objektívne posúdiť. Žiadna látka nevykazovala významnú antifungálnu ani antibakteriálnu aktivitu. Látky s perspektívnou antimykobakteriálnou aktivitou boli ďalej testované na *in vitro* cytotoxicitu.

4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina bola skôr popísaná ako potenciálne netoxické antituberkulotikum, účinné najmä proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC 10,7 μM). V rámci objasnenia vzťahu štruktúra-účinnok u tejto zlúčeniny, bola pripravená rada derivátov, kde bol fenylový kruh rôzne substituovaný. Zmeny v substitúcii viedli ako k zachovaniu aktivity, tak k jej strate.

V rámci karboxy derivátov vykazovali aktivitu voči *M. tbc* H37Rv v rozmedzí MIC 6,25–50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ štyri zlúčeniny. Látka JZ-JZ1 ($\text{R}^1=\text{COOH}$ $\text{R}^2=\text{OH}$,) vykazovala hodnotu MIC 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Substitúcia $-\text{OH}$ u R^2 za $-\text{Cl}$ (JZ-JZ2) rovnako tak jeho odstránenie (JZ-JZ6 R) viedlo k vyšším hodnotám MIC (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). U derivátu JZ-JZ7 ($\text{R}^1=\text{OH}$ a $\text{R}^2=\text{COOH}$) viedla zmena polôh substituentov k hodnote MIC 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z týchto poznatkov je možné odvodiť, že substituenty OH a COOH priaznivo ovplyvňujú účinok *N*-fenyl-5-chlórpyrazín-2-karboxamidového derivátu, pričom je nutné zachovať polohy 1 a 2 respektíve pro COOH a OH. Proti *M. smegmatis* vykazovala najlepšiu aktivitu zlúčenina JZ-JZ4 majúca ako substituenty $\text{R}^1=\text{COOH}$ a $\text{R}^2=\text{OCH}_3$ (MIC 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Táto zlúčenina však nemá aktivitu proti ostatným kmeňom. Ďalej boli aktívne zlúčeniny JZ-JZ1 a JZ-JZ2 (MIC respektíve 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Látka JZ-JZ6 R vykazovala ako jediná slabú aktivitu proti všetkým testovaným kmeňom (MIC 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre kmene *M. tbc*, *M. kansasii*, *M. avium*; 125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ u *M. aurum* a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pre *M. smegmatis*) a bola zároveň jedinou

zlúčeninou vykazujúcou antimykobakteriálnu aktivitu proti kmeňom *M. aurum*, *M. avium* a *M. kansasii*.

Medzi esterovými derivátmi bola aktívna iba zlúčenina JZ-JZ12. Proti *M. tbc* H37Rv vykazovala hodnotu MIC 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Účinná je však iba k tomuto kmeňu. Ester najúčinnnejšej látky JZ-JZ1 sa cez všetky snahy nepodarilo pripraviť s dostatočným výťažkom.

Z poznatkov o vzťahu štruktúra-účinok je možné usúdiť, že k zachovaniu širšieho spektra a nízkych hodnôt MIC je dôležitá substitúcia $\text{R}^1=\text{COOH}$ a $\text{R}^2=\text{OH}$ na fenylovom kruhu. Táto substitúcia korešponduje usporiadanie PAS, z čoho vyplýva, že fragment PAS v pyrazínamidovom deriváte je dôležitý pre čo najmenšiu možnú antimykobakteriálnu aktivitu.

Vzťah štruktúra-účinok odvodený z pripravených derivátov je však platný iba v rámci antimykobakteriálnej aktivity, ako nám dokazujú výsledky testovania *in vitro* cytotoxicity (HepG2). Zlúčenina JZ-JZ1 majúca najlepšiu antimykobakteriálnu aktivitu ($6.25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sa javí ako toxická s hodnotou SI 7,50. Najlepšiu hodnotu SI vykazovala látka JZ-JZ7 (14.22), ktorej antimykobakteriálna aktivita je však o niečo horšia než u látky JZ-JZ1 (*M. tbc* H37RV $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zlúčeniny JZ-JZ2, JZ-JZ4 a JZ-JZ12 sú vysoko toxické (hodnoty SI v rozmedzí 0.36 až 1.78).

Z tohto poznatku je možné usúdiť, že pre zachovanie nízkej toxicity sú dôležité substituenty $\text{R}^1=\text{OH}$ a $\text{R}^2=\text{COOH}$.

6. ZÁVER

Prvá časť diplomovej práce popisovala súčasný epidemiologický stav tuberkulózy, roky používané liečivá v antituberkulotickej terapii a liečivá novo zavedené, či stále vyvíjané. Rešeršná práca popísala výsledky skôr pripravených derivátov pyrazínamidu a zhrnula poznatky o ich vzťahu štruktúra-účinok.

Experimentálna časť bola založená na poznatku o aktivite 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenoovej kyseliny. Štruktúrne obmeny tejto zlúčeniny viedli k syntéze 13 derivátov, s nimi boli prevedené antimykobakteriálne, antifungálne a antibakteriálne testy. Z týchto pripravených 13 derivátov, bolo 12 nových, v literatúre doposiaľ nepopísaných zlúčenín (podľa CAS SciFinder ku dňu 14.3.2018). Podľa ref. Zitko a kol. skôr popísaná látka 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamid)-2-hydroxybenzoová kyselina mala hodnotu MIC 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Štruktúra a totožnosť pripravených zlúčenín bola overená pomocou ^1H NMR, ^{13}C NMR spektier a IR spektra. Ďalej bola u látok zmeraná teplota topenia a elementárna analýza. Hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$ boli vypočítané v programe ChemDraw, ktorý slúžil tiež k spracovaniu chemických vzorcov a obdržaniu teoretických hodnôt elementárnej analýzy. V tejto časti boli tiež popísané metódy používané k príprave jednotlivých derivátov.

Látky JZ-JZ1 a JZ-JZ2 boli obe aktívne voči *M. tbc* H37Rv a *M. smegmatis*, avšak JZ-JZ1 vykazovala lepšiu aktivitu (MIC 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ďalej boli aktívne voči *M. tbc* H37Rv tiež deriváty JZ-JZ6 a JZ-JZ7. *M. smegmatis* bolo citlivé tiež na derivát JZ-JZ4, ktorý mal voči tomuto kmeňu najlepšiu aktivitu (MIC 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Žiadna látka nemala antifungálny či antibakteriálny účinok.

Po analýze obdržaných výsledkov bolo usúdené, že najlepší vplyv na antimykobakteriálny účinok mali substituenty $\text{R}^1=\text{COOH}$ a $\text{R}^2=\text{OH}$. Takto substituovaný fenylový kruh svojím usporiadaním predstavuje

fragment PAS, z čoho vyplýva, že pre zachovanie najlepšej antimykobakteriálnej aktivity je vhodná kombinácia fragmentu PZA a PAS.

Najlepší vplyv na cytotoxicitu majú substituenty ($R^1=OH$, $R^2=COOH$) látky JZ-JZ7, ktorá vykazovala druhú najlepšiu antimykobakteriálnu aktivitu (*M. tbc* H37Rv 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Cieľom tejto práce bolo zistenie vplyvu štrukturálnych obmien 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoovej kyseliny na jej antimykobakteriálny účinok.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chémie a farmaceutické analýzy

Riešiteľ: Jana Žecová

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Zlúčeniny kombinujúce fragment pyrazínamidu a 4-aminobenzoovej kyseliny ako potencionálne antituberkulotiká

Tuberkulóza je závažné infekčné ochorenie, ktoré po storočia sužuje ľudskú svetovú populáciu. Jej stále zastúpenie v rebríčku najsmrteľnejších ochorení, rovnako tak ako výskyt foriem rezistentných na terapiu, naďalej vyžaduje seriózný prístup k tejto problematike a nájdení nových terapeutických možností. V škále liečiv súčasnej terapie TBC sa vyskytujú dve látky, PZA a PAS. Pyrazínamid je liečivo 1. línie, jeho derivátmi sa roky zaoberá výskum na Katedre farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy. Štruktúrne podobná 4-aminobenzoovej kyseline, PAS je antituberkulotikom 2. línie, ktoré sa po rokoch znovu stáva aktuálnym v liečbe rezistentných foriem *M. tbc*. Táto diplomová práca sa zaoberá možnosťami využitia zlúčenín zložených z fragmentu PZA a 4-aminobenzoovej kyseliny ako potencionálnych antituberkulotík. Práca naďalej zhodnocuje vplyv fragmentu PAS v derivátoch pripravovaných s antimykobakteriálnym účelom.

Teoretická časť práce popisuje súčasný svetový stav tuberkulózy, jej charakteristiky a liečivá používané v antituberkulotickej terapii. Väčšia pozornosť je venovaná PZA a PAS, ktoré sú kľúčové zlúčeniny praktickej časti. Ďalej prezentuje výsledky rešeršnej práce ohľadne skôr pripravených derivátov pyrazínamidu a ich vzťahu štruktúra-účinnok.

Praktická časť práce nadväzuje na skoršie poznatky ohľadne účinku 4-(5-chlórpyrazín-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoovej kyseliny, ktorá bola vyhodnotená ako potencionálne netoxické liečivo účinné voči *M. tbc* H37Rv (MIC 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). V rámci vyjasnenia vzťahu štruktúra-účinok tejto zlúčeniny a prospešnosti štruktúrnych obmien na antimykobakteriálnu aktivitu, bola pripravená séria 13 derivátov. Deriváty boli testované voči *M. tbc* H37Rv, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. smegmatis* a *M. aurum*.

Bola hodnotená tiež ich antifungálna a antibakteriálna aktivita, avšak ani jedna zlúčenina neprejavovala aktivitu voči skúšaným kmeňom. Deriváty aktívne proti *M. tbc* H37Rv vykazovali hodnoty MIC v rozmedzí 6,25–50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ za použitia INH ako štandardu (0,2 $\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$). Bola zaznamenaná aj aktivita voči *M. smegmatis*.

V poslednom rade bola tiež testovaná *in vitro* cytotoxicita perspektívnych derivátov. Deriváty vykazovali hodnoty SI v rozmedzí 0,36 až 14,22.

8. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical chemistry and Pharmaceutical analysis

Author: Jana Žecová

Supervisor: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Title of diploma thesis: Compounds combining pyrazinamide and 4-aminobenzoic acid fragments as potential antituberculars

Tuberculosis is a severe infectious disease, which has been afflicting the human world population for centuries. It's figuring in the scale of the deadliest diseases as well as the occurring of strains resistant to therapy requires a serious approach to this problem and the research of new therapeutic means. Among the actual antituberculars figure two compounds, PZA and PAS. Pyrazinamide is a first line drug, and its derivatives are subject of the research in the Department of Pharmaceutical chemistry and Pharmaceutical analysis. Structurally similar to 4-aminobenzoic acid, PAS is a second line antitubercular, which is again actual in the therapy of resistant form of TBC. This diploma thesis treats about possibilities of the use of compounds combining fragments of PZA and 4-aminobenzoic acid as potential antituberculars. Furthermore, this thesis evaluates the influence of PAS fragment in the derivatives prepared with this antimycobacterial purpose.

The theoretical part describes the actual state of tuberculosis in the world, its characteristics and drugs used in the therapy of tuberculosis. More attention is paid to PZA and PAS, as these compounds are essential to the practical part. It also presents the results of the research about derivatives of pyrazinamide previously synthesized and their structure-activity relationship.

The practical part is based on the previous knowledge about the activity of 4-(chloropyrazine-2-carboxamide)-2-hydroxybenzoic acid, which has been evaluated as potential non toxic drug against *M. tbc* H37Rv (MIC 3.13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). To clarify the structure-activity relationship of this compound and the benefit of structural changes on the antimycobacterial activity, a series of 13 compound has been synthesized. The derivatives were tested on *M. tbc* H37RV, *M. smegmatis*, *M. avium* a *M. kansasii*.

Their antifungal and antibacterial activity has also been evaluated, but no compound showed such activity against tested strains. Derivatives active against *M. tbc* H37Rv presented MIC values in the scale of 6.25–50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ with INH used as comparative standard (0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). An activity against *M. smegmatis* has also been detected.

Finally, the *in vitro* cytotoxicity of perspective derivatives has been evaluated. The tested derivatives presented SI values in the scale of 0.36 to 14.22.

9. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- (1) Bartu, M. Tuberkulóza - infekční choroba v 21. století. *Medicina pro praxi* **2008**, 5, 245-248.
- (2) Kolek, p. M. V.; DrSc. Tuberkulóza - transformace péče, její výhody a rizika. *Medicina pro praxi* **2012**, 9, 220-221.
- (3) World Health Organisation: Global tuberculosis report 2017. Geneva, **2017**; 22-31.
- (4) World Health Organisation: Global tuberculosis report 2017. Geneva, **2017**; 31-39.
- (5) Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2016. Ústav zdravotnických informací a statistiky: Praha, **2016**.
- (6) Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E., 3rd; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**, 393, 537-544.
- (7) Alsteens, D.; Verbelen, C.; Dague, E.; Raze, D.; Baulard, A. R.; Dufrene, Y. F. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Pflugers Arch* **2008**, 456, 117-125.
- (8) Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews* **2005**, 18, 81-101.
- (9) Ptakova, M. M.; Csc. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterioz. *Medicina pro praxi* **2011**, 8, 466-468.
- (10) Dheda, K.; Barry, C. E., 3rd; Maartens, G. Tuberculosis. *The Lancet* **2016** 387, 1211-1226.
- (11) Wong, E. B.; Cohen, K. A.; Bishai, W. R. Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis. *Trends Microbiol* **2013**, 21, 493-501.
- (12) Hartl, J. a kol.: Farmaceutická chemie IV.; Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum: Praha, **2012**; 119-124.
- (13) Laborde, J.; Deraeve, C.; Bernardes-Genisson, V. Update of Antitubercular Prodrugs from a Molecular Perspective: Mechanisms of Action, Bioactivation Pathways, and Associated Resistance. *Chemmedchem* **2017**, 12, 1657-1676.
- (14) Isoniazid. *Tuberculosis* **2008**, 88, 112-116.
- (15) Zumla, A. I.; Gillespie, S. H.; Hoelscher, M.; Philips, P. P. J.; Cole, S. T.; Abubakar, I.; McHugh, T. D.; Schito, M.; Maeurer, M.; Nunn, A. J. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases* **2014**, 14, 327-340.
- (16) Rifampin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 151-154.

- (17) Campbell, E. A.; Korzheva, N.; Mustaev, A.; Murakami, K.; Nair, S.; Goldfarb, A.; Darst, S. A. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* **2001**, *104*, 901-912.
- (18) Murakami, K. S. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules* **2015**, *5*, 848-864.
- (19) Ethambutol. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 102-105.
- (20) Zhang, Y.; Shi, W.; Zhang, W.; Mitchison, D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum* **2014**, *2*, Mgm2-0023-2013.
- (21) Peterson, N. D.; Rosen, B. C.; Dillon, N. A.; Baughn, A. D. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **2015**, *59*, 7320-7326.
- (22) Kim, H.; Shibayama, K.; Rimbara, E.; Mori, S. Biochemical Characterization of Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e100062.
- (23) Pyrazinamide. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 141-144.
- (24) Wong, E. B.; Cohen, K. A.; Bishai, W. R. Rising to the challenge: new therapies for tuberculosis. *Trends in Microbiology* **2013**, *21*, 493-501.
- (25) Arbex, M. A.; Varella Mde, C.; Siqueira, H. R.; Mello, F. A. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia* **2010**, *36*, 641-656.
- (26) Moxifloxacin. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, *88*, 127-131.
- (27) Levofloxacin. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 119-121.
- (28) Hartl, J. a kol.: Farmaceutická chemie IV.; Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum: Praha, **2012**;113-116.
- (29) Caminero, J. A.; Sotgiu, G.; Zumla, A.; Migliori, G. B. Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infectious Dis* **2010**, *10*, 621-629.
- (30) Capreomycin. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, *88*, 89-91.
- (31) Ethionamide. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, *88*, 106-108.
- (32) Prothionamide. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 139-140.
- (33) Cycloserine. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, *88*, 100-101.
- (34) Donald, P. R.; Diacon, A. H. Para-aminosalicylic acid: the return of an old friend. *Lancet Infectious Disease* **2015**, *15*, 1091-1099.
- (35) Zheng, J.; Rubin, E. J.; Bifani, P.; Mathys, V.; Lim, V.; Au, M.; Jang, J.; Nam, J.; Dick, T.; Walker, J. R.; Pethe, K.; Camacho, L. R. para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 23447-23456.
- (36) Para-aminosalicylic acid. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, *88*, 137-138.
- (37) Karpiuk, I.; Tyski, S. Looking for the new preparations for antibacterial therapy. V. New antimicrobial agents from the oxazolidinones groups in clinical trials. *Przegląd Epidemiologiczny* **2017**, *71*, 207-219.
- (38) Linezolid. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 122-125.
- (39) Hoagland, D. T.; Liu, J.; Lee, R. B.; Lee, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *102*, 55-72.

- (40) Cox, E.; Laessig, K. FDA Approval of Bedaquiline — The Benefit–Risk Balance for Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine* **2014**, *371*, 689-691.
- (41) <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0209090&tab=texts>, stiahnuté 18.03.2018.
- (42) TMC-207. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 168-169.
- (43) Xavier, A. S.; Lakshmanan, M. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapy* **2014**, *5*, 222-224.
- (44) OPC-67683. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 132-133.
- (45) PA-824. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 134-136.
- (46) LL-3858. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 126.
- (47) SQ109. *Tuberculosis* **2008**, *88*, 159-161.
- (48) Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E., 3rd; Boshoff, H. I. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **2012**, *56*, 1797-1809.
- (49) Doležal, M.; Zitko, J.; Osicka, Z.; Kuneš, J.; Vejsová, M.; Buchta, V.; Dohnal, J.; Jampílek, J.; Kralová, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2010**, *15*, 8567-8581.
- (50) Doležal, M.; Cmedlová, P.; Pálek, L.; Vinšová, J.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Jampílek, J.; Kralová, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European journal of medicinal chemistry* **2008**, *43*, 1105-1113.
- (51) Zitko, J.; Servusová, B.; Paterová, P.; Mandiková, J.; Kubíček, V.; Kučera, R.; Hrabcová, V.; Kuneš, J.; Soukup, O.; Doležal, M. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2013**, *18*, 14807-14825.
- (52) Zitko, J.; Servusová, B.; Janoutová, A.; Paterová, P.; Mandiková, J.; Garaj, V.; Vejsová, M.; Marek, J.; Doležal, M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 174-183.
- (53) Servusová-Vanasková, B.; Paterová, P.; Garaj, V.; Mandiková, J.; Kuneš, J.; Naesens, L.; Jílek, P.; Doležal, M.; Zitko, J. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 6-Alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Biology & Drug Design* **2015**, *86*, 674-681.
- (54) Zitko, J.; Franco, F.; Paterová, P. Synthesis and anti-infective evaluation of 5-amino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Česká a Slovenská farmacie : časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti* **2015**, *64*, 19-24.
- (55) Servusová, B.; Eibinova, D.; Doležal, M.; Kubíček, V.; Paterová, P.; Pesko, M.; Kralová, K. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules* **2012**, *17*, 13183-13198.
- (56) Servusová-Vanasková, B.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Kubíček, V.; Kučera, R.; Kuneš, J.; Doležal, M.; Zitko, J.: Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation, *Medicinal Chemistry Communications* **2015**; *6*,1311.

- (57) Semelková, L.; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Kubíček, V.; Kuneš, J.; Doležal, M.; Zitko, J. 3-Substituted *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamide Derivatives: Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Evaluation. *Molecules* **2017**, *22*.
- (58) Servusová, B.; Vobicková, J.; Paterová, P.; Kubíček, V.; Kuneš, J.; Doležal, M.; Zitko, J. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic Medicinal & Chemistry Letters* **2013**, *23*, 3589-3591.