

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Rigorózní práce



Deriváty pyrazinu jako potencionální antituberkulotika

Mgr. Lenka Slavětinská

Hradec Králové 2013

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

25. 10. 2013 v Hradci Králové

Mgr. Lenka Slavětinská

.....

Rigorózní práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (grantu GAUK B-CH/710312) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (SVV 2013-267-001) a Ministerstva zdravotnictví ČR – projekt IGA NT 13346 (2012).

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



Touto cestou bych ráda poděkovala školiteli, prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za vedení této rigorózní práce, za celkovou podporu a humor při jejím zhotovování. Dále děkuji konzultantovi PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost v průběhu celého vypracovávání a Mgr. Báře Servusové za milý přístup a praktickou laboratorní navigaci. Samozřejmě dále patří poděkování všem, kteří mají významný podíl na zpracování experimentálních dat nově syntetizovaných látek, jako jsou jejich analýzy a biologická hodnocení.

OBSAH

I. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
II. ÚVOD.....	8
III. CÍL PRÁCE.....	10
IV. TEORETICKÁ ČÁST	11
1. Tuberkulóza	11
1.1. <i>Etiologie tuberkulózy – Mycobacterium tuberculosis complex</i>	11
1.2. <i>Patogeneze tuberkulózy</i>	13
1.3. <i>Epidemiologie tuberkulózy</i>	16
1.4. <i>Epidemiologie rezistentních forem TBC</i>	19
1.5. <i>Koinfekce tuberkulózy a HIV a jejich epidemiologie</i>	20
2. Farmakoterapie tuberkulózy.....	22
2.1. <i>Antituberkulotika první linie</i>	22
2.1.1. Isoniazid (INH)	22
2.1.2. Rifampicin (RIF)	23
2.1.3. Ethambutol (EMB).....	24
2.1.4. Pyrazinamid (PZA)	25
2.2. <i>Antituberkulotika druhé linie, chemoterapeutika a léky v klinických studiích</i>	28
2.2.1. Aminoglykosidová antibiotika	28
2.2.2. Glykopeptidová antibiotika	29
2.2.3. Kyselina <i>para</i> -aminosalicylová	29
2.2.4. Thioamidy isonikotinové kyseliny	30
2.2.5. Cykloserin a terizidon.....	30
2.2.6. Fluorochinolony.....	31
2.2.7. 1,3-oxazolidinony	32
2.2.8. Další chemoterapeutika, ATB a nová potencionální antituberkulotika	33

3. Jednoduché chemické obměny struktury pyrazinu	37
3. 1. <i>Substituce pyrazinového jádra</i>	<i>37</i>
3. 2. <i>Funkční deriváty karboxylových kyselin</i>	<i>38</i>
V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4. Použité chemikálie, přístroje a analytické metody	40
5. Experimentální měření lipofility	41
6. Biologická hodnocení připravených látek: postupy	42
6. 1. <i>Testování antimykobakteriální aktivity</i>	<i>42</i>
6. 2. <i>Testování antifungální aktivity</i>	<i>42</i>
6. 3. <i>Testování antibakteriální aktivity</i>	<i>43</i>
7. Experimentální měření cytotoxicity	44
8. Postup přípravy finálních produktů:	45
9. Výchozí látky	46
10. Nově připravené látky – finální produkty	50
11. Výsledky biologických hodnocení	62
11. 1. <i>Antimykobakteriální aktivita</i>	<i>62</i>
11. 2. <i>Antifungální aktivita</i>	<i>64</i>
11. 3. <i>Antibakteriální aktivita</i>	<i>65</i>
VI. DISKUSE A KOMENTÁŘ	67
12.1. <i>Syntéza</i>	<i>67</i>
12.2. <i>Lipofilita finálních struktur</i>	<i>67</i>
12. 3. <i>Hodnocení biologické aktivity</i>	<i>69</i>
12. 4. <i>Cytotoxicita testovaných látek</i>	<i>70</i>
VII. ZÁVĚR	72
VIII. ABSTRAKT	74
IX. ABSTRACT	75
X. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	76

I. Seznam použitých zkratk

Seznam použitých zkratk

antiTBC - antituberkulotika

AMB – amfotericin B

ATB – antibiotikum

ATP – adenosintrifosfát

CCM – Czech Collection of Microorganisms (Česká sbírka mikroorganismů)

CDCl₃ – deuterovaný trichlormethan

CIP – ciprofloxacín

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

CNS – centrální nervová soustava

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonucleic acid (kyselina deoxyribonukleová)

DST – drug susceptibility testing (testování lékové náchylnosti)

EMB – ethambutol

EtOAc - ethylacetát

FAS – Fatty Acid Synthase (syntéza mastných kyselin)

FDA – Food and Drug administration

FLU – flukonazol

GIT – gastrointestinální trakt

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IC₅₀ – inhibiční koncentrace

IL 1/ IL 12 – interleukin 1/12

INF γ – interferon gama

INH – isoniazid

IR – infrared spectroscopy (infračervená spektroskopie)

KAOCH – Katedra anorganické a organické chemie

KFCHKL – Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

KI – jodid draselný

MDR-TB – Multi Drug Resistant Tuberculosis

MHB – Mueller Hintonův bujon

MIC – minimální inhibiční koncentrace

M/XDR-TB – Multi and Extensively Drug Resistant Tuberculosis

NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid (redukována forma)

NMR – nukleární magnetická resonance

NÚ – nežádoucí účinky

PAS – kyselina *para*-aminosalicylová

PEN – penicilin G

PHE – fenoxymethylpenicilin

POA – kyselina pyrazinkarboxylová

PZA – pyrazinamid

RIF – rifampicin

RNA – ribonucleic acid (kyselina ribonukleová)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium

SI - selectivity index (index selectivity; $SI=IC_{50}/MIC$)
SZÚ – Státní zdravotní ústav
TBC – tuberkulóza
TLC – thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TMS – tetramethylsilan
TNF- α – tumor nekrotizující faktor α
UV – ultraviolet (ultrafialové)
VL – výchozí látka
WHO – World Health Organizatin (Světová zdravotnická organizace)
XDR-TB – Extensively Drug Resistant Tuberculosis
5-Cl-PZA – 5-chlorpyrazin-2-karboxamid

II. Úvod

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené infekční onemocnění, které je řazené mezi specifické zánětlivé procesy a jež se vyskytuje u lidí tisíce let. Původcem TBC jsou určité kmeny bakterií ze skupiny *Mycobacterium (M.) tuberculosis complex*, mezi něž patří *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanus* a *M. microti*, přičemž infekce způsobená *M. tuberculosis* je ve výrazné většině. V současné době je TBC stále považována za závažný celosvětový problém. Světová zdravotnická organizace (WHO) odhaduje, že třetina světové populace je nosičem určitého druhu mykobaktérií vyvolávající toto onemocnění, u většiny těchto přenašečů však infekce přechází do latentní (klidové) formy a klinicky se neprojevuje. V 21. století je každým rokem po celém světě diagnostikováno přibližně 8 milionů nových případů TBC a každoročně registrováno zhruba 1,5 milionu úmrtí v rámci této infekce, což je alarmujícím důkazem, že TBC je stále rozsáhlým zdravotnickým problémem.

Bakterie rodu *Mycobacteria* mají ve srovnání s jinými humánními patogeny řadu specifických vlastností, které výrazně zvyšují problematiku a dlouhodobost terapie. Jedná se zejména o schopnost intracelulárního parazitismu spojenou s možností určitého procenta patogenu přebývat ve fagocytárních lysozomech ve stadiu dormance, tedy ve spánkovém režimu s minimální metabolickou aktivitou. Dalším výrazným specifickým je extrémně lipofilní buněčná stěna a její obaly.

Farmakoterapie nekomplikovaných infekcí zahrnuje v současnosti zejména antituberkulotika (anti-TBC) první linie, kdy základem léčby jsou tři až čtyři anti-TBC po dobu nejčastěji šesti až devíti měsíců. U komplikovaných případů (infekce rezistentními kmeny, relapsy, výrazné nežádoucí účinky) jsou aplikovány i anti-TBC druhé linie i léky ve fázi klinických studií, u nichž je nutná dlouhodobější terapie, nejčastěji osmnáct až dvacet čtyři měsíců. Farmakoterapie je poté nutná i s vyšším počtem anti-TBC (až sedm různých účinných látek).

Pyrazinamid (PZA), jeden z derivátů pyrazinu (z nichž vychází základ této rigorózní práce), patří mezi anti-TBC první linie, je obsažen ve všech základních farmakoterapeutických režimech TBC. Mechanismus účinku pyrazinamidu je

baktericidní se sterilizujícími účinky, založen pravděpodobně na inhibici výstavby buněčné stěny a je aktivní i proti dormantním mykobaktériím. PZA je na základě všeobecné teorie považován za proléčivo, jež je v těle metabolizováno na pyrazinkarboxylovou kyselinu (POA), která je vlastní účinnou látkou. Vzhledem k mechanismu účinku, zkrácení doby terapie, relativně nízkému výskytu nežádoucích účinků (NÚ) je snaha syntetizovat další deriváty pyrazinu, nejlépe s vyšší antibakteriální účinností v nižších dávkách, s maximální dostupností do místa účinku, s nižšími NÚ a ideálně i za nízkou výrobní cenu. Základní molekulou, na které je založena metodická část této práce (syntéza a hodnocení), je substituovaný anilid kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové. Samotný 5-chlorpyrazin-2-karboxamid (5-Cl-PZA) byl syntetizován již v 90. letech minulého století, kdy u něj byla zjištěna významná *in vitro* aktivita vůči *M. tuberculosis* a i dalším PZA rezistentním formám mykobaktérií, což poukázalo na pravděpodobnost specifického účinku této látky, který nebyl předpokládán. Ačkoliv potenciál antimykobakteriálního účinku 5-Cl-PZA nebyl dosud v literatuře hlouběji uveden, nadále je základ této struktury rozsáhle používán k syntézám dalších analog.

III. Cíl práce

Cílem této práce je v teoretické části stručný souhrn základních specifík TBC, její infekční agens, přehled farmakoterapeutik, možnosti léčby a současný celosvětový výskyt tohoto onemocnění.

V praktické části je pak hlavním cílem příprava nových, v literatuře dosud nepopsaných, derivátů pyrazinu resp. POA, jejich fyzikálně-chemická charakteristika dostupnými metodami a testování jejich antituberkulotické aktivity. U vybraných látek i rozšířenější testování, týkající se antibakteriální a antifungální aktivity proti konkrétním kmenům výrazně patogenních pro člověka (např. *Staphylococcus aureus*). Příprava derivátů anilidů POA jako potencionálních antituberkulotik je součástí dlouhodobého výzkumu na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové vedeného prof. Doležalem a jeho kol., týkajícího se rozsáhlé série anilidů. U řady již syntetizovaných anilidů byla prokázána povzbudivá antimykobakteriální aktivita, což je právě podpora syntézy nových derivátů a jejich dalšího testování.

IV. Teoretická část

1. Tuberkulóza

TBC je celkové infekční onemocnění, řazené mezi specifické zánětlivé procesy, původce TBC jsou bakterie rodu *Mycobacterium* (*M.*), mezi něž patří *Mycobacterium tuberculosis* (nejčastější lidský patogen), *M. bovis*, *M. africanus* a *M. microti*. Název tuberkulóza je pak odvozen z latinského slova *tuberculum* = uzlíček, který je patologicko-anatomickým projevem tohoto zánětu. [1] Znamky tuberkulózního onemocnění byly prokázány již na archeologických nálezích nejstarších dob, konkrétně v období neolitu, tedy přibližně 7000 let před naším letopočtem [2] a právě i vzhledem ke stáří mykobakteriálního rodu lze tento patogen považovat za vysoce adaptovaný a schopný překračovat základní mechanismy lidského imunitního systému. Až do poloviny dvacátého století byla TBC jednou z nejrozšířenějších celosvětových epidemií. Základním přínosem pro poznání TBC a tím i pro začátek boje proti ní byl objev jejího původce. Dne 24. 3. 1882 v Berlíně přednesl Robert Koch své sdělení „O tuberkulóze“ [1], ve kterém byla sepsána dokumentace o nálezích etiopatologického agens TBC, proto je *M. tuberculosis* také často označován jako Kochův bacil. Na počest tohoto objevu byl 24. březen vyhlášen WHO za „Světový den TBC. [1, 2]

1.1. Etiologie tuberkulózy – Mycobacterium tuberculosis complex

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. microti* a *M. africanus* – tyto čtyři kmeny bývají označovány jako *Mycobacterium tuberculosis complex*. Bovinní TBC se v současnosti vyskytuje nejméně (v České republice prakticky bez výskytu) zejména díky eliminaci postiženého skotu. *M. africanum* se vyskytuje pouze v oblastech západní Afriky. [3]

M. tuberculosis patří mezi nejčastější patogen způsobující TBC (více než 90 % celosvětově, v našem pásmu prakticky jediný), jedná se o obligatorně aerobní nesporulující tyčku o velikosti 0,5 x 3-5 µm, s optimálním růstem při teplotě 37-38 °C a dlouhou generační dobou: 24 - 48 hodin [3], zatímco u běžných patogenů se jedná řádově o desítky minut. Buněčné obaly mykobaktérií mají vysoký obsah lipidů

(znatelný rozdíl oproti běžným humánním bakteriím), což je příčinou jejich typických vlastností jako acidorezistence, alkalirezistence a alkoholrezistence. Vysoce lipofilní obaly jsou tak jedním z hlavních důvodů virulence mykobaktérií, přispívají k maskování antigenních znaků mykobaktérií (ochrana před imunitní odpovědí hostitele), jsou příčinou vzniku rezistence vůči řadě antibiotik (bariérová funkce způsobující sníženou možnost prostupu ATB do ložiska infekce) a také umožňují mykobaktériím odolávat vyschnutí a přežívat ve volném prostředí – v kapénkách mohou přežívat 1-2 hodiny a jsou odolné i proti nízkým teplotám. [3] Dle současného poznání se buněčné stěny mykobaktérií skládají ze tří vrstev: plazmatické membrány, buněčné stěny a nekovalentně připojených vrstev lipidů, glykanů a proteinů. [4]

Mykobaktéria jsou schopna fakultativního parazitismu, v organismu mohou přežívat jak intracelulárně tak extracelulárně v místech s různým pH. Jejich další významnou vlastností je schopnost perzistence, možnost měnit metabolickou aktivitu, současnou životní formu, což je u TBC dalším důvodem nižší možnosti dosažení úplné eradikace mykobaktérií z organismu pacienta. [3]

DĚLENÍ POPULACÍ MYKOBAKTÉRIÍ [5]

1. Mykobaktéria s vysokou metabolickou aktivitou – vyskytují se extracelulárně, v kavernách, v oblastech se zásaditým pH
2. Mykobaktéria se střídající se metabolickou aktivitou – extracelulárně, v kaseu, v neutrálním pH
3. Mykobaktéria s nízkou metabolickou aktivitou – intracelulárně nebo extracelulárně v kyselém pH (okraje kaseózních lézí)
4. Dormantní formy neboli spící TBC bacily – intracelulárně, nejnižší metabolická aktivita – tato populace je nejsložitější pro léčbu TBC

1.2. Patogeneze tuberkulózy

Nejčastějším zdrojem infekce mykobaktériemi je kapénkový přenos (uvolnění aerosolu) z dýchacích cest infikovaného pacienta s otevřenou formou TBC na zdravého jedince. [5]

Obecně se uvádí, že celosvětově je infikována 1/3 populace, avšak ne u každého infikovaného vypukne manifestní forma TBC. Manifestace probíhá u méně než 10 % infikovaných osob (v různém období od primární infekce), její propuknutí je závislé na několika faktorech, zejména na genetické predispozici a specifické charakteristice hostitele a dále na virulenci a množství inokulentních mykobaktérií, kdy je rozhodující délka a expozice infekci. U většiny infikovaných se pak vyvíjí tzv. postinfekční imunita. [3; 5]

Nejvyšším rizikem propuknutí TBC je oslabená funkce imunitního systému, zejména jeho buněčné složky. Výskyt TBC je nejčastěji pozorován u HIV pozitivních jedinců, dále například u diabetes mellitus, alkoholismu či malnutrici. Vyšší rizika jsou do jisté míry závislá i na věku nakažených, a to hlavně u dětí ve věku 2-5 let, díky dozrávání buněčných složek imunity a také u seniorů díky vyššímu výskytu přidružených nemocí. [5]

TRADIČNÍ DĚLENÍ TBC

1) Primární tuberkulóza

Vzniká jako reakce hostitele na první kontakt s mykobakteriální infekcí. Po vdechnutí kapének se infekční agens dostává do plicních sklípků, kde je pohlcováno alveolárními makrofágy, začíná se množit a vyvolává tak lokální zánětlivou reakci. Neaktivované makrofágy nejsou schopny mykobaktéria usmrtit a k dělení tak dochází intracelulárně v lysozómech makrofágů. [6] Během několika hodin se patogeny šíří lymfatickou cestou do regionálních uzlin, které se zvětšují a spolu se zánětlivým plicním ložiskem vytvářejí primární tuberkulósový komplex, tzv. Ghonův fokus. [3] Ve většině případů se proces díky rozvoji buněčné imunity spontánně zhojí (u očkovaných během 10-14 dnů, u neočkovaných v průběhu 4-8 týdnů). Imunitní systém však v začátku infekce nemá vytvořeny paměťové mechanismy a ohraničení

infekce není spolehlivá u všech infikovaných. [5] Základními cytokiny, které usměrňují imunitní reakci jsou IL-1 produkovaný makrofágy, IL-12 tvořený dendritickými buňkami, INF- γ a TNF- α vznikající v T-lymfocytech CD4+ a CD8+. [7]

Po imunitní aktivaci se T-lymfocyty a aktivované makrofágy shlukují kolem ložiska infekce, dochází tak ke splývání buněk a oddělení ložiska infekce od okolního prostoru, toto ložisko je označováno jako granulom, jehož střed je vyplněn nekrotickou tkání a odumřelými makrofágy. Dle výsledného sýrového vzhledu a konzistence je tento proces nazýván jako kaseifikace ložiska. Reakce imunitního systému touto cestou snižuje možnost replikace mykobakterií, které vlivem nepříznivých podmínek přechází do latentní fáze a stávají se tak perzistory TBC, které v klidovém stavu mohou u hostitele přežívat léta až desetiletí. [6]

II) Postprimární tuberkulóza

Postprimární TBC vzniká u již dříve infikovaných jedinců v důsledku dvou možných procesů: exogenní reinfekcí (nová mykobaktériální infekce) nebo endogenní reaktivací primárního ložiska (progrese či reaktivace primárního komplexu – uzlinové nebo plicní komponenty). [5] K reaktivaci primární TBC dochází spontánně nebo na základě snížené schopnosti imunitního systému. Reakce imunitního systému je podstatně prudší ve srovnání s primární TBC, dochází k zapojení paměťových buněk a vzniku infiltrátu s tendencí ohraničování procesu a tvorbou kaseózní nekrózy. Zatímco u primární TBC převládá v buněčné imunitě Th1 odpověď, u postprimární TBC je spuštěn i Th2 systém aktivovaný pomocí TNF- α a imunitní reakce probíhá zejména na základě paměťových buněk. Vznikající granulomy jsou tak zřetelně rozsáhlejší a kaseifikace intenzivnější a destruktivnější. U většiny nemocných nastávají v této fázi specifické symptomy: nápadná únava, nechutenství, výrazné hubnutí, pokles fyzické výkonnosti, subfebrilie, pocení, suchý, později produktivní kašel (často provázen produkcí mukopurulentního sputa, či různě závažnou hemoptýzou), který je hlavním činitelem kápenkového rozsevu infekce. [6]

MIMOPLICNÍ TBC [1]

Mimoplicní forma TBC se vyskytuje asi u 15 % nemocných. Během vytváření primárního komplexu (i několik měsíců poté) se mohou mykobaktéria šířit krevním proudem do nových lokalit v plicích a do jiných orgánů mechanismem hematogenní diseminace. Stejně jako u klasičtější plicní formy TBC se při nižším počtu mykobaktérií nemusí hematogenní rozsev klinicky manifestovat (letální forma), stává se však také zdrojem možné pozdější mimoplicní TBC.

Dělení

TBC nervové soustavy – závažná život ohrožující komplikace, může postihnout každou strukturu CNS, nejčastější lokalizace na mozkových plenách. Vyšší komplikace i v možnostech terapie – nutnost účinných látek prostupujících přes hematoencefalickou bariéru.

TBC kostí a kloubů – jedna z nejčastějších lokalizací mimoplicní TBC, nejčastěji bývá postižena páteř, koleno a kyčel.

TBC močové a pohlavní soustavy – onemocnění začíná obvykle v oblasti ledvinné kůry s postupným šířením k ledvinným papilám, ledvinné pánvičce, ureteru a močovému měchýři, dále může dojít i k postižení uteru či prostaty.

Tuberkulózní periferní lymfadenopatie – patří také mezi častější formy mimoplicní TBC, uzliny jsou postiženy v rámci lymfahematogenního šíření patogenů z ložiska infekce.

TBC střev, pobřišnice a mezenterických uzlin – rozvoj této infekce může být do zažívacího traktu přenesen i na základě spolknutí kontaminovaného sputa – výjimečný přenos.

TBC kůže a kožního vaziva – vznik infekce může být z endogenního i exogenního zdroje. Často vznikají bolestivé a obtížně se hojící ulcerace.

TBC oka – často dochází k jednostrannému postižení, poškozené mohou být vnější struktury (keratokonjunktivitida), uvea, choriodea či sítnice.

TBC ucha – výjimečná infekce, průběh spíše nespecifický odpovídající zánětu středního ucha.

TBC nadledvin – v současnosti vzácná příčina manifestní insuficience nadledvin.

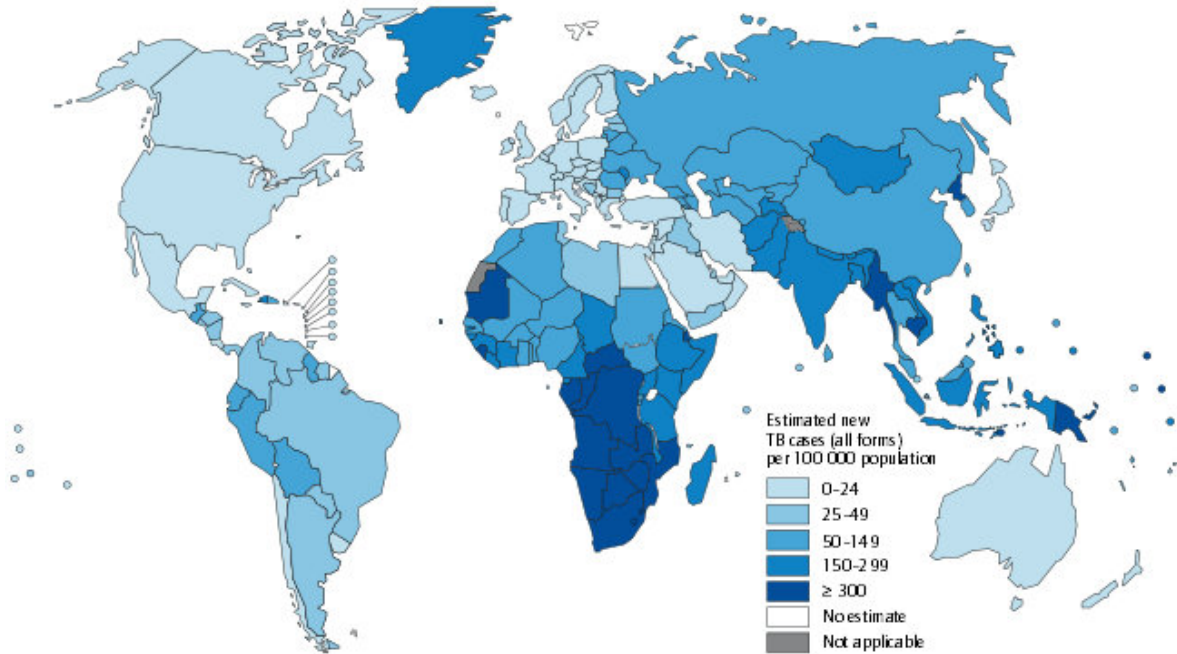
1.3. Epidemiologie tuberkulózy

Již řadu let je TBC označována za závažnou infekční chorobu celého světa. Jedná se o onemocnění, u kterého bylo původně očekáváno (v rámci WHO), že bude na konci 20. století vymýceno minimálně v západní Evropě a v USA. K tomuto očekávání však dosud nedošlo a TBC zůstává stále podstatnou příčinou nemoci a úmrtnosti v rámci infekčních onemocnění. [8]

Z hlediska celosvětového výskytu TBC, jsou ve WHO vydávány již od roku 1994 každoroční výroční zprávy o nárůstu TBC ve světové populaci. Ve výroční zprávě z roku 2012, prezentující rok 2011, bylo publikováno, že počet nových případů TBC neboli incidence byla zaznamenána u 8,7 milionu lidí, což v celosvětovém měřítku udává 125 případů na 100 000 obyvatel. U 13 % nově infikovaných byly rovněž prokázány HIV pozitivní testy. Celkový počet nakažených neboli prevalence pak činilo zhruba 12 milionů lidí a úmrtnost neboli mortalita byla zaznamenána u 1,4 milionu infikovaných, z čehož HIV pozitivních činilo zhruba 31 %. Asi 93 % případů TBC spadá ve světě pod rozvojové země. Nejvyšší výskyt TBC je pak uváděn na území Asie 59 % (zejména Indie, Čína, Indonésie a Pákistán), subsaharské Afriky 26 % a východního středomoří 7,7 %. Relativní minimum pak spadá pod evropský (4,3 %) a americký (3 %) region (viz obr. 1). [9] Z těchto základních parametrů jasně vyplývá, že vyšší výskyt TBC se nachází zejména v rozvojových zemích, kde je vyšší počet sociálně slabých, dále řada těchto postiženějších území prochází válečnými konflikty a zejména v Africe a Indii je vysoké procento obyvatel HIV pozitivních, což výrazně zvyšuje riziko infekce TBC, viz dále. [10]

Obrázek 1: Odhad incidence TBC ve světě dle WHO v roce 2011 (počet případů/100 000 obyvatel). Převzato se svolením WHO, WHO document no. WHO/HTM/TB/2012.6 [9].

FIGURE 2.5 Estimated TB incidence rates, 2011



V rámci České republiky je výskyt TBC na relativně příznivé úrovni. V roce 2009 byla TBC incidence 6,8/100 000 obyvatel - v praxi byla diagnostikována u 710 osob, což je ve srovnání s celosvětovým průměrem pozitivní. [11] Od objevení streptomycinu (r. 1946) a dalších antituberkulotik v následujících letech je zaznamenáván stálý pokles incidence TBC. Jediný mírný nárůst onemocnění na území ČR byl pak vnímán pouze v průběhu devadesátých let, kdy byl způsoben především příchodem vyššího počtu emigrantů z rozvojových zemí. Od počátku 21. století, kdy došlo ke stabilizaci přílivu přistěhovalců, je opět zaznamenán pokles incidence TBC (viz tab. I). [12]

Tabulka I: Hlášené počty případů TBC v ČR v letech 2001-2008 dle SZÚ. [12]

NOTIFIKACE TBC V ČR 2001 – 2008				
ROK	TBC DÝCH. ÚSTROJÍ	TBC JINÁ	CELKEM	/100000 OBYVATEL
2001	1185	165	1350	13,1
2002	1037	163	1200	11,8
2003	1011	151	1162	11,4
2004	909	148	1057	10,4
2005	896	111	1007	9,9
2006	856	117	973	9,5
2007	790	81	871	8,4
2008	793	86	879	8,4

1.4. Epidemiologie rezistentních forem TBC

V současné době se stále rozsáhleji rozvíjí celosvětový problém v šíření multirezistentních forem *M. tuberculosis*. Rezistentní formy se dělí na dvě základní skupiny – multidrug resistant tuberculosis (=MDR-TB), kdy se jedná o *M. tuberculosis* rezistentní na léčbu dvěma základními antituberkulotiky první linie, zahrnující v tomto případě isoniazid a rifampicin. Druhá rezistentní forma – extensively drug resistant tuberculosis (=XDR-TB) je rozšířena rezistencí i na léky druhé linie – konkrétně na fluorochinolinová antibiotika a alespoň jedno léčivo ze skupiny intravenózních aminoglykosidů zahrnující amikacin, kapreomycin a kanamycin. [13; 14] Délka léčby těchto komplikovaných forem pak vyžaduje často 2 roky a více a kombinaci 4 a více léčiv (podstatně delší léčba, než u klasické formy TBC zahrnující nejčastěji půlroční terapii) vzhledem k rezistenci a specifickému průběhu dělení mykobaktérií a jejich možných životních stádií, což celkově výrazně komplikuje jak dostupnost terapie v řadě států, tak compliance řady pacientů. [15]

Obě rezistentní formy jsou v současnosti pandemickým problémem, jejich nález byl stanoven ve všech zemích s výskytem TBC, kde bylo možné provést testy na jejich bakteriální přítomnost, tzv. DST (drug susceptibility testing). [16] Dle WHO bylo v roce 2011 odhadováno až 400 000 nových případů MDR-TB, z čehož zhruba u 9 % byla diagnostikována závažnější forma XDR-TB. Celkově činil výskyt rezistentních forem 3,7 % všech případů TBC. Ve srovnání s čísly z předešlého reportu nedošlo k výrazným změnám. [16; 17]

Ačkoliv je prevalence rezistentních forem celosvětová, nejvyšší procento je očekávaně vztaženo zejména na rozvojové země. Nejvyšší počet těchto případů spadá pod asijský kontinent, kde Čína, Indie, Pákistán, Bangladéš a Indonésie tvoří více než 50 % celosvětového výskytu rezistentních forem TBC. [18] Dále Afrika, konkrétněji subsaharská Afrika, spadá pod nejzatíženější oblasti v rámci výskytu rezistentních forem TBC. Celkově tyto oblasti patří pod nejrizikovější části světa týkající se všech forem TBC. Na vzniku M/XDR-TB se zde do jisté míry podílí synergie TBC s HIV koinfekcí, která výrazně ovlivňuje průběh a léčbu TBC. [19]

Rizikovými faktory pro vznik infekce M/XDR-TB jsou u pacienta zejména imunosupresivní stavy (zahrnující rozsáhlou problematiku – zdravotní i sociální rizika) a relaps tuberkulózy zahrnující již předchozí léčbu. Avšak M/XDR-TB je již

zaznamenávána i jako primoinfekce u neimunosuprimovaných jedinců, což je důkaz hrozby rozvoje rozsáhlejší epidemie tohoto typu TBC. [20] Dalším častým faktorem ovlivňujícím riziko vzniku rezistentních kmenů mykobaktérií je špatná indikace antituberkulotik, neadekvátní nízká dávka vedoucí k pomalé odpovědi organismu a stimulaci vzniku rezistence, popřípadě aplikace pouze jednoho léčiva nedostačujícího k eradikaci mykobaktérií a podporující rezistenci, což je dáno v nejhroženějších zemích ekonomickou nestabilitou jak léčených, tak často i praktických lékařů. [20]

1.5. Koinfekce tuberkulózy a HIV a jejich epidemiologie

Koinfekce HIV a tuberkulózy a jejich současná epidemiologie jsou celosvětově rozsáhlým problémem. Dle WHO údajů bylo v posledních letech zaznamenáno přibližně 34 miliónů lidí nakažených infekcí HIV, z čehož asi u 15 miliónů byla diagnostikována i infekce TBC. [21] Z druhého úhlu pohledu, v roce 2011 bylo zaznamenáno 8,7 miliónů nových případů TBC, z čehož u 1,1 milionů (13 %) nakažených byla potvrzena infekce HIV, 79 % těchto HIV-pozitivních TBC případů bylo zaznamenáno v africkém regionu. [9] Jak z prevalence HIV, tak z incidence TBC jasně vyplývá nepřehlédnutelná synergie mezi těmito infekcemi. Dosud však nebylo podrobněji analyzováno, jak se patogeny vzájemně ovlivňují. [9; 21]

Tuberkulóza je zaznamenána jako nejčastější příčina smrti u HIV-pozitivních pacientů, tento fakt by měl v současnosti vést u lidí s diagnostikovanou HIV k následnému potvrzení či vyvrácení možné infekce TBC a naopak. Aby byla ihned zahájena komplexní léčba infikovaných pacientů. Riziko výskytu TBC u HIV pozitivních jedinců je 21 – 37krát vyšší než u HIV negativních. Překvapivě však HIV infekce nezvyšuje riziko vzniku rezistentních forem TBC, jak bylo původně odhadováno, z těchto důvodů je toto zjištění v současné době též v procesu hlubších výzkumů. [22] Dosud bylo v rozsáhlé meta-analýze zjištěno, že u HIV pozitivních jedinců je vysoké riziko přenosu primární infekce TBC, zatímco rezistentní formy jsou na HIV infekci zcela nezávislé. [23; 24] V dalších méně rozsáhlých studiích zaměřených na jednotlivé státy byl publikován pouze mírný rozdíl, z 83 států byl pouze v 7 z nich potvrzen vyšší výskyt M/XDR-TBC u HIV pozitivních, avšak ani

jeden ze států nespadal na území subsaharské Afriky, kde je výskyt HIV nejvyšší a neukazoval na jasnou souhru výskytu M/XDR-TBC s HIV. [24]

Jak u samotné tuberkulózy nebo HIV, tak u synergie obou závažných onemocnění se WHO stále snaží vyhledat nejlepší možnou cestu prevence a terapie těchto infekcí, aby nedocházelo ke stále rozšířenější celosvětové pandemii.

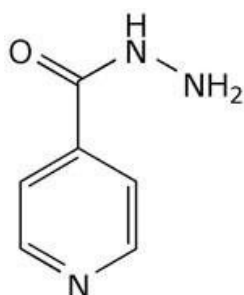
2.Farmakoterapie tuberkulózy

Standardní farmakoterapie nekomplikované tuberkulózy probíhá nejčastěji plných šest měsíců. U komplikovaných případů, zejména u léčby rezistentních forem TBC, může být terapie prodloužena až na čtyřicet měsíců. Léčba TBC je z hlediska přístupu pacientů poměrně složitá. Často jde o nemocné ze sociálně slabých vrstev bez dostatečného finančního zajištění, nebo o pacienty pocházející z oblastí s minimálním dostupem ke kvalitní zdravotnické péči a tím pádem i s nízkou dostupností kvalitních antituberkulotik, z čehož vyplývá základní problematika samotné léčby i compliance jednotlivých pacientů. Vzhledem k začáteční dobré adherenci pacienta k léčbě dochází k vymizení subjektivních potíží již po několika týdnech terapie nekomplikované TBC, kdy na léčbu (díky její délce) často nasedají nežádoucí účinky léků, tyto dva fakty často způsobují vysokou noncompliance pacienta a samostatné ukončení léčby. Což je dle průzkumů WHO asi nejčastější příčinou vzniku komplikovaných rezistentních forem TBC.

Z mnoha důvodů je v průběhu vývoje nadále řada nových antituberkulotik a to z důvodů finanční dostupnosti pro pacienty po celém světě, snahy o zkrácení terapie a minimalizaci nežádoucích účinků a samozřejmě snaha o postupné vymizení infekce TBC.

2.1. Antituberkulotika první linie

2.1.1. Isoniazid (INH)

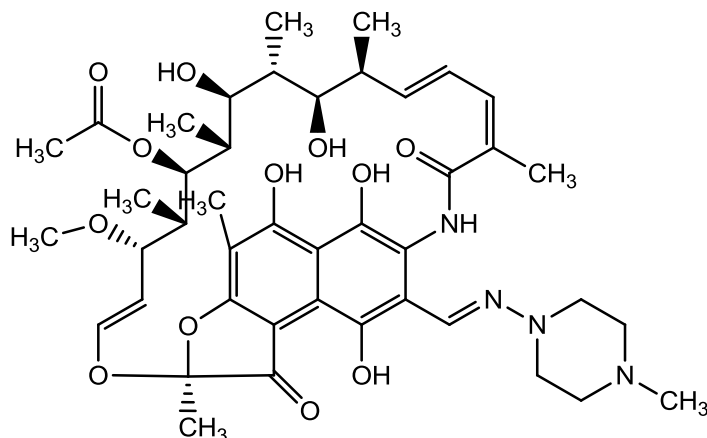


Isoniazid, chemicky hydrazid kyseliny isonikotinové, byl, podobně jako pyrazinamid, objeven hledáním analogů antituberkuloticky účinného nikotinamidu. Jedná se o první perorální, celkově druhé (1. streptomycin, intravenózní, r. 1946) antituberkulotikum objevené roku 1952. [25]

Mechanismus účinku: Isoniazid působí selektivně a baktericidně na extra- i intracelulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky. Jedná se o inhibitor esenciálních enzymů podílejících se na tvorbě mykolových kyselin mykobaktérií, které jsou podstatné pro tvorbu buněčné stěny. [26] Isoniazid je mykobakteriální endogenní katalasou-peroxidasou KatG za účasti NAD^+ oxidován na reaktivní nestabilní meziprodukt, který se stabilizuje vazbou na NADH. Vzniká tak kovalentně vázaný adukt INH-NAD, který pak působí jako inhibitor řady enzymových systémů mykobaktérie využívající právě NAD k syntéze mykolových kyselin buněčné stěny. Nejvýznamnějším inhibovaným enzymem je enoyl ACP reduktasa, která je součástí enzymatického komplexu FAS II, je tak základní pro tvorbu mykolových kyselin. [27; 28]

Rezistence: Častá. Nejčastěji inhibice KatG. [29] Při léčbě TBC vždy v kombinaci i s jinými léky. Samostatné využití pouze k profylaxi. [26]

2.1.2. Rifampicin (RIF)

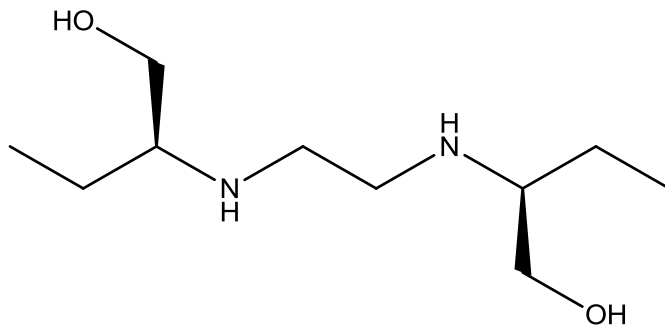


Rifampicin je řazen do skupiny ansamycinových antibiotik, základ struktury tvoří makrocyclický laktamový kruh. Jedná se o silné baktericidní antibiotikum řazené do skupiny antituberkulotik, ze kterých má nejvyšší baktericidní účinek na spící i rostoucí mykobaktérie. Antimikrobiální spektrum rifampicinu dále vykazuje baktericidní účinky na bakterie *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitis*, *Haemophilus influenzae*, chlamydie a legionely. Vysoká lipofilita RIF zajišťuje průchod hematoencefalickou bariérou a umožňuje tak léčbu komplikovaných meningitid. [29; 30]

Mechanismus účinku: Inhibice prokaryotické syntézy bakteriálních nukleových kyselin vazbou na DNA-dependentní RNA-polymerasu.

Rezistence: Nejčastěji mutace rpoB, genu kódujícího β jednotku DNA-dependentní RNA-polymerasy. [31]

2.1.3. Ethambutol (EMB)

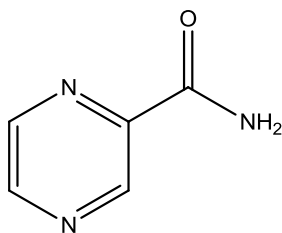


Ethambutol je strukturálně látkou typu jednoduchého aminoalkoholu. Působí bakteriostaticky pouze na rostoucí kmeny mykobaktérií. Léčba TBC ethambutolem je opět možná pouze v kombinaci s dalšími antituberkulotiky.

Mechanismus účinku: Není dosud zcela objasněn. Nejčastěji publikovaný mechanismus účinku je, vzhledem ke strukturní podobnosti ethambutolu s D-arabinosou, inhibice arabinosyl transferasy. [32] Jedná se o inhibici polymerizace arabinanu a z něj vycházejících komponent, které patří mezi významné substráty pro tvorbu buněčné stěny mykobaktérií. [32; 33; 34]

Rezistence: Mutace v oblasti klastru genů embABC kódujících arabinosyl transferasy EmbA, EmbB a EmbC. [34]

2.1.4. Pyrazinamid (PZA)



(pyrazinamid a jeho deriváty jsou hlavním tématem této rigorózní práce, proto je této části věnován podrobnější přehled)

Chemicky se jedná o amid kyseliny pyrazinkarboxylové neboli pyrazin-2-karboxamid. Pyrazinamid je antituberkulotikum zavedené do léčby TBC již v roce 1952 [35] a dodnes patří mezi antituberkulotika první volby indikovaná hned do úvodu léčby TBC v kombinaci s rifampicinem, isoniazidem a ethambutolem. Jedná se o bakteriostatické až baktericidní chemoterapeutikum (v závislosti na koncentraci) působící ve slabě kyselém prostředí a s významnou synergií s rifampicinem. Ačkoliv od roku 1952 byla z pyrazinamidu substituována řada derivátů, stále je z tohoto hlediska samotný pyrazinamid na vrcholu využití a účinnosti. [35; 36]

Mechanismus účinku: Ze všeobecně uznávané teorie mechanismu účinku je pyrazinamid uváděn jako proléčivo, které proniká pasivní difúzí do bakteriální buňky, kde je působením pyrazinamidasy/nikotinamidasy (PncA) hydrolyzován na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA), která je vlastní účinnou látkou. [37] Vzniklá POA pak vystupuje z buňky do extracelulárního prostoru pasivní difúzí i aktivním efluxním mechanismem. V acidifikovaném extracelulárním prostředí se pak malá koncentrace POA vyskytuje v neutrální protonizované formě (HPOA), která pasivní difúzí proniká zpět do intracelulárního prostoru, kde dochází k její akumulaci a díky tomu acidifikaci plazmy, což významně působí na narušení transmembránového protonového gradientu a inhibici základních vitálních enzymů – inhibice syntézy ATP – syntézy NAD. [38; 39] Tento základní a všeobecně uznávaný mechanismus účinku je považován za nespecifický děj vycházející zejména z fyzikálně-chemických vlastností POA a jež je podporován i faktem, že dosud nebyla izolována rezistentní skupina *M. tuberculosis* vůči samotné POA.

Rezistence: Nejčastější příčinou je mutace genu *pncA* (substituce aminokyselin v promotorové části genu), vedoucí ke ztrátě enzymatické aktivity pyrazinamidasy/nikotinamidasy zapříčiňující hydrolyzu PZA na aktivní POA. [35; 40]

Přestože výše uvedená fakta jsou nejuznávanější a podložena již řadou rozsáhlých vědeckých publikací, proběhla a stále probíhá řada dalších studií zjišťujících možné alternativní specifické cesty působení PZA/POA na konkrétní mykobakteriální subcelulární cíl.

Mezi tři v současnosti nejčastěji zmiňované teorie specifického mechanismu účinku patří *inhibice Fatty Acid Synthase I* (FAS I) vlivem PZA/POA a jejich derivátů. FAS I je komplex enzymů mající podstatný vliv na syntézu vyšších mastných kyselin, které jsou esenciální složkou vnějších obalů mykobaktérií. Tato teorie nebyla dosud plně prokázána, ale existuje již řada studií, které se jí podrobně věnují. Pro zájemce o podrobnější informace, odkaz viz [41; 42] Další dosud nepotvrzená teorie vychází ze strukturální podobnosti PZA/POA s nikotinamidem a kyselinou nikotinovou, *PZA/POA jsou odhadovány jako falešné analogy nikotinamidu/kyseliny nikotinové v syntéze NAD⁺* (nikotinamid adenin dinukleotidu). Nikotinamid a kyselina nikotinová patří mezi hlavní výchozí látky pro syntézu NAD⁺, z čehož vychází předpoklad, že za přítomnosti PZA/POA jsou vytěsňovány ze syntézy NAD⁺ a dochází tak ke tvorbě nefunkčních analog NAD⁺, nebo je zde předpoklad, že mohou mít vliv na inhibici určitých enzymů podílejících se na syntéze NAD⁺ (např. inhibice *pncA*). [43] Třetí nejnovější teorie popisuje *PZA/POA jako inhibitor trans-translace*. Trans-translace je specifický ribozomální pochod, který umožňuje uvolnění a degradaci vzniklého defektního proteinového řetězce. [44] Vzhledem k acidifikaci plazmy vzniklé intracelulární akumulací POA je odhadován zvýšený výskyt defektních proteinů, které díky současné inhibici trans-translace rovněž vlivem POA nejsou degradovány, z čehož vychází předpoklad vzniku defektních forem mykobaktérií a jejich usmrcení. Pro zájemce hlubší přehled viz seznam literatury. [44, 45]

I přes to, že od počátku zavedení terapie PZA byla snaha vyvinout jeho nová, cílenější a účinnější analoga, stále je na vrcholu funkce a využití prvotní PZA. Studie zabývající se vývojem analog měly a stále mají základ v chemické obměně struktury

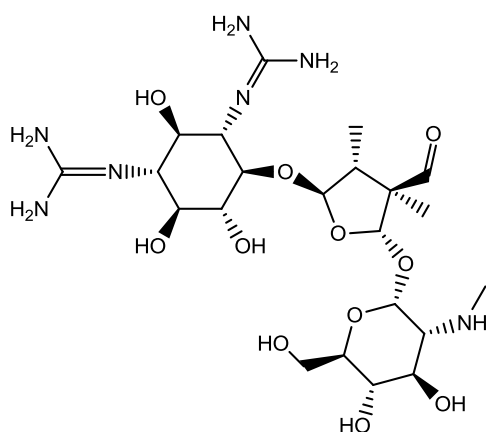
PZA. Mezi rozsáhle testované strukturální obměny patří zejména jednoduché substituce pyrazinového jádra, jednoduché obměny karboxamidové funkce, estery pyrazinkarboxylové kyseliny, **N-substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny** (syntéza a testování těchto pyrazinových analog jsou i základem metodické části této rigorózní práce) a řada dalších metodicky složitějších struktur. (stručný souhrn viz kapitola 3)

Studii výše uvedené problematiky se již řadu let rozsáhle věnuje i katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv na farmaceutické fakultě v Hradci Králové, kam spadá tato práce.

2.2. Antituberkulotika druhé linie, chemoterapeutika a léky v klinických studiích

Mezi antituberkulotika druhé linie jsou řazena léčiva indikovaná na rezistentní formy TBC k některým léčivům první linie. Ačkoliv jsou v praxi rovněž nepostradatelná, mají oproti léčivům první volby řadu nevýhod, proto k indikaci dochází až po zjištění komplikovanější formy TBC. Nevýhodami je zejména nižší účinnost, vyšší výskyt výraznějších nežádoucích účinků, často i nízká terapeutická šíře a do určité míry i nedostupnost některých léčiv (zejména v rozvojových zemích, kde je výskyt TBC nejvyšší).

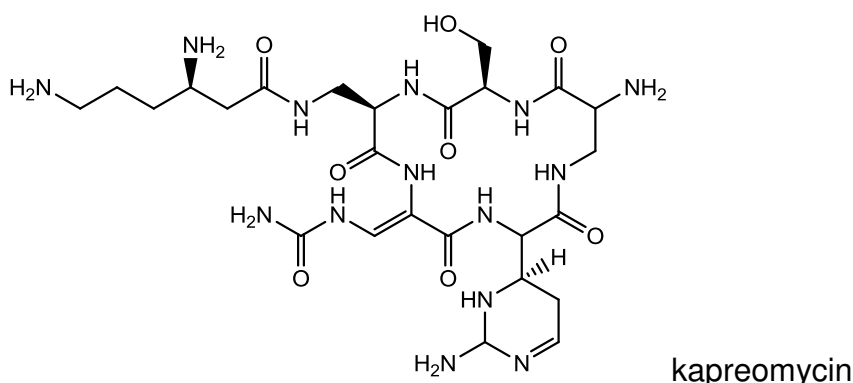
2.2.1. Aminoglykosidová antibiotika



streptomycin

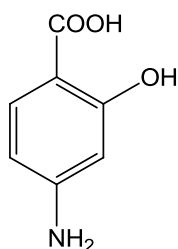
Jedná se o antibiotika, strukturálně trisacharidy až tetrasacharidy obsahující alespoň jeden monosacharid, zavedená do praxe již ve čtyřicátých letech dvacátého století a i v dnešní době patřící mezi stále využívaná antituberkulotika. [46] Hlavním mechanismem účinku je inhibice bakteriální proteosyntézy díky vazbě na ribozómovou podjednotku 30S. [47] Vzhledem k nutné dlouhodobé terapii se často vyskytují hlavní vážnější nežádoucí účinky jako nefrotoxicita a ototoxicita. V současnosti patří pod stále využívaná antituberkulotika zejména streptomycin (1946 – zavedení do terapie TBC) a kanamycin. [46; 47]

2.2.2. Glykopeptidová antibiotika



Z hlediska strukturálního uspořádání jsou tato antibiotika řazena mezi heteromerní polypeptidy – polypeptidový systém obsahuje rovněž různé glykosidicky vázané cukry. [48] Jedná se o baktericidní antibiotka, jejichž mechanismus účinku spočívá ve specifické inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny. Nežádoucí účinky jsou s výskytem a závažností srovnatelné s aminoglykosidovými antibiotiky, rovněž nefrotoxicita a ototoxicita. Pod léčiva této skupiny indikovaná v současnosti spadají například kapreomycin a viomycin. [48; 49]

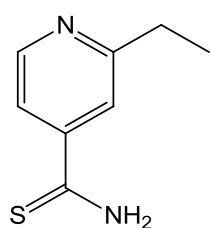
2.2.3. Kyselina *para*-aminosalicylová



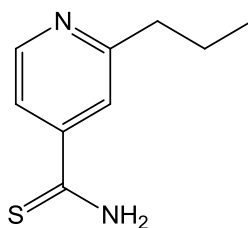
Kyselina *para*-aminosalicylová (PAS) patří mezi jedny z prvních používaných antituberkulotik, do terapie byla zavedena již v roce 1946. [48] Mechanismus účinku není dodnes přesně znám, je však odhad, že stojí na kompetitivní inhibici *para*-aminobenzoové kyseliny, tedy na ovlivnění syntézy dihydrolistové kyseliny. [50] Nebo, vzhledem ke struktuře PAS, na chelataci železa a ovlivnění jeho metabolismu na úrovni mykobaktérií. Jeden z důvodů dříve častějšího využití je i potenciace účinku isoniazidu a streptomycinu. V současnosti je PAS ve vyspělých státech

prakticky bez využití. Zejména kvůli častému vzniku rezistence a nutnosti podání vysokých dávek k její účinnosti, což vede i k vysokému výskytu nežádoucích účinků. Na druhou stranu, vzhledem k nízkým nákladovým cenám, drží v indikaci stále určité nezanedbatelné místo v rozvojových zemích. [48; 50]

2.2.4. Thioamidy isonikotinové kyseliny



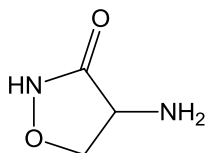
ethionamid



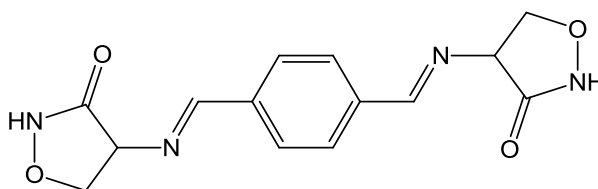
prothionamid

Ethionamid a prothionamid jsou hlavními látkami této skupiny, v praxi využívané již od padesátých let minulého století. [48] Strukturálně i mechanismem účinku jsou blízké isoniazidu, jde o baktericidní látky resp. proléčiva působící jako inhibitory biosyntézy mykolových kyselin buněčné stěny mykobaktérií. [51] Vzhledem k vyšší toxicitě (časté GIT poruchy, hepatitida, periferní neuropatie) a často rychlému rozvoji rezistence jejich využití v průběhu vývoje dalších antituberkulotik klesá, ale přesto jsou i v současnosti nadále využívány v terapii určitých rezistentních forem TBC, nebo v terapii lepry. [51; 52]

2.2.5. Cykloserin a terizidon



cykloserin



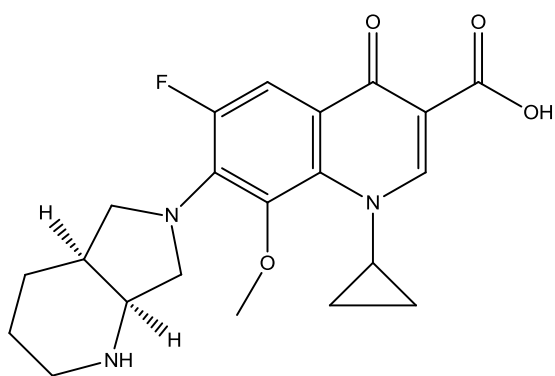
terizidon

Cykloserin i terizidon mají strukturální základ jako cyklická analoga D-alaninu, který je klíčovou složkou pentapeptidu tvořícího peptidoglykan buněčné stěny mykobaktérií. Mechanismus účinku vyplývá z inhibice stavby peptidoglykanu díky kompetici mezi D-alaninem a cykloserinem/terizidonem. [53] Vzhledem k častému

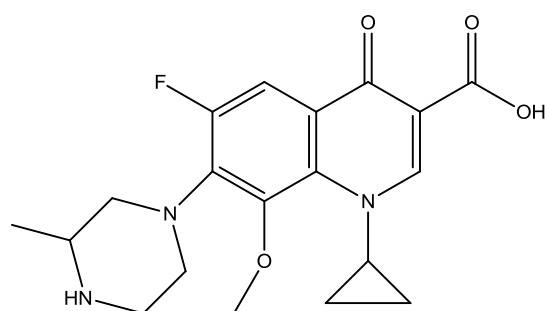
vzniku rezistence a vyšší toxicitě při dlouhodobé aplikaci (závratě, deprese, psychózy, křečovitě záchvaty) se od terapie těmito léky rovněž upouští. [52]

2.2.6. Fluorochinolony

Ačkoliv fluorochinolony nespádají přímo do skupiny antituberkulotik, již od konce 80. let minulého století roste využití těchto chemoterapeutik i v terapii TBC. [48] Jedná se o baktericidní chemoterapeutika, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici topoizomerázy II, enzymu odpovědného za správné zřetězení a rozvolnění superhelikální DNA během replikace. [30] Z konkrétních látek lze zmínit již starší ofloxacin a levofloxacin, dále pak novější fluorochinolony zahrnující **moxifloxacin** a **gatifloxacin**, které jsou v průběhu 3. fáze klinických studií v rámci nových indikací těchto látek, zahrnující právě TBC. Z výsledků jejich účinnosti a snášenlivosti při dlouhodobé terapii bude pak vycházet možnost jejich využití k léčbě TBC v budoucnosti. [52; 54] Celkově však mají fluorochinolony v indikaci široký rozsah, jejich baktericidní účinek je prokázán např. vůči *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter spp.*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a řadě dalších kmenů. [30]



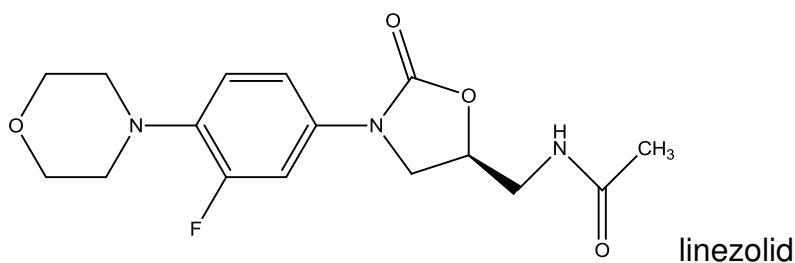
moxifloxacin



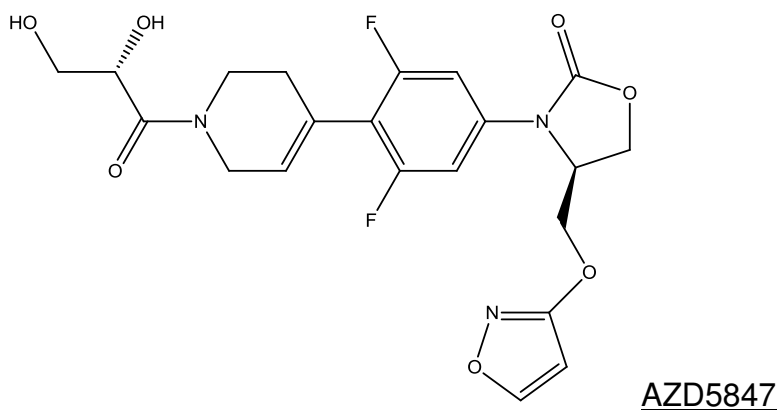
gatifloxacin

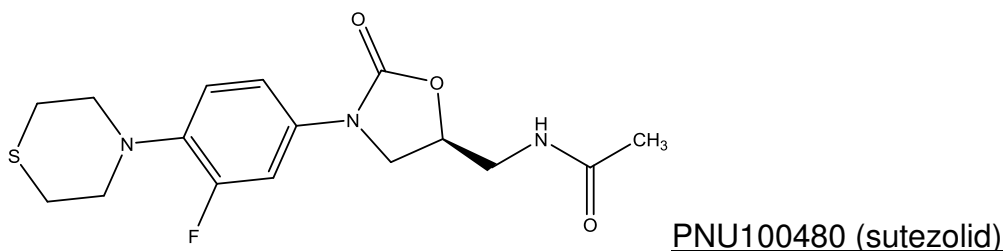
2.2.7. 1,3-oxazolidinony

Stejně jako fluorochinolony jsou 1,3-oxazolidinony řazeny mezi chemoterapeutika avšak s významným antituberkulotickým účinkem. Jedná se o mladší skupinu látek s mechanismem účinku spočívajícím v inhibici syntézy proteinů v časně fázi translace. [55] Ze zástupců této skupiny má v současnosti nejvyšší význam a využití **linezolid**, který je zatím jediným u nás registrovaným, rezervním chemoterapeutikem této skupiny. [55] Hlavním indikačním využitím je léčba nozokomiálních infekcí vyvolaných bakterií *Staphylococcus aureus* [56] a v současnosti právě i terapie MDR-TB a XDR-TB, která se nachází ve druhé fázi klinických studií. [57]



Dalšími 1,3-oxazolidinonovými deriváty, se shodným mechanismem účinku jako u výše uvedeného linezolidu a v dnešní době rovněž ve druhé fázi klinických studií, jsou **AZD5847** [58] – u něhož je srovnatelná i toxicita jako u linezolidu, avšak lepší biologická dostupnost [59] a dále **PNU100480** (sutezolid), jež je thioanalogem linezolidu a u kterého byla prokázána vyšší terapeutická šíře a nižší nežádoucí účinky. [59]





2.2.8. Další chemoterapeutika, ATB a nová potencionální antituberkulotika

V současnosti, vzhledem k přetrvávající pandemické situaci TBC, je neustále snaha vytvořit větší škálu účinných látek. Jedná se jak o zcela nová potencionální antituberkulotika, nebo analoga již zavedených antituberkulotik (řada již v různých fázích klinických studií), tak o chemoterapeutika a antibiotika, která přesto, že jsou již řadu let využívána v jiných indikacích, jsou v posledních letech rovněž vkládána do klinických studií na zjištění jejich antituberkulotické aktivity. Dále samozřejmě i zcela nová chemoterapeutika s předpokládanou možností indikace na větší množství bakteriálních kmenů. Celkově je v současnosti ve vývoji a testování vyšší množství látek, než za posledních 40 let. [59]

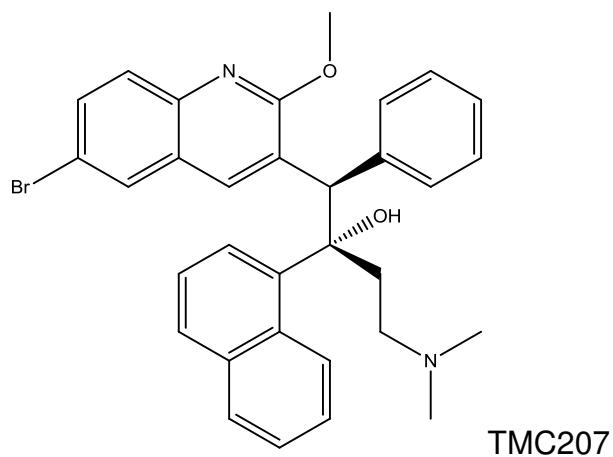
Mezi dlouhodobě využívaná chemoterapeutika, mající prokázaný i antituberkulotický účinek, patří stejně jako výše zmiňované fluorochinolony např. **clofazimin** - strukturálně riminofenazin, který je jako antileprotikum v terapii již od padesátých let 20. století. [58] V dnešní době je stále podáván i u některých forem rezistentních forem TBC, hlavní nevýhodou je jeho vysoká toxicita. [60; 61] Z klasických antibiotik je pak pro příklad v klinickém hodnocení i účinek známého beta-laktamového ATB a to **amoxicilinu** s kyselinou klavulánovou. [62]

Mezi strukturálně nová potencionální antituberkulotika pak patří více látek spadajících hned do několika skupin a to:

- **DIARYLCHINOLONY**

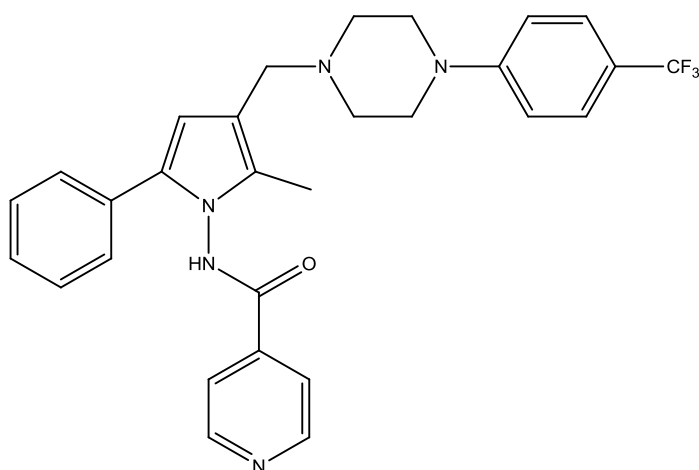
Nejvýznamnější látkou této skupiny je **TMC207** (bedachilin). Mechanismus účinku je založen na inhibici protonového přenašeče mykobakteriální ATP syntázy [63], což je vzhledem k vysoké rozdílnosti tohoto enzymu od eukaryotické buňky ideálním místem selektivního působení proti mykobaktériím. [64] V roce 2012 byl TMC207 (bedachilin) zaregistrován společností FDA (Food and Drug Administration) jako

antituberkulotikum. Jedná se tak, po čtyřiceti letech, o první nově registrované antituberkulotikum. [65] Testování jeho účinnosti se nachází ve druhé fázi klinických studií. [59] Z provedených testů nebyly dosud zaznamenány žádné závažnější nežádoucí účinky ve srovnání s placebo skupinou, častěji se vyskytovala pouze nauzea. [59]



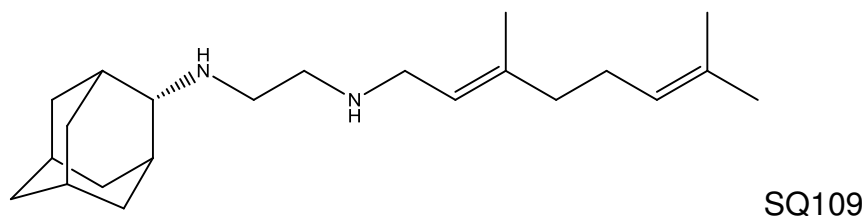
• PYRROLY

Za nejvýznamnějšího zástupce této skupiny je považována látka **LL3858** (sudoterb). [66] Jedná se o derivát pyrrolu, u kterého je vazba na -N pyrrolu zastoupena strukturou isoniazidu. [67] LL3858 se v současné době nachází ve druhé fázi klinických studií, přičemž mechanismus účinku nebyl dosud popsán. [66] V dosavadních studiích byl zatím prokázán výrazný baktericidní (resp. inhibiční) účinek, v monoterapii silnější než je popisován u monoterapie samotným isoniazidem. [67]



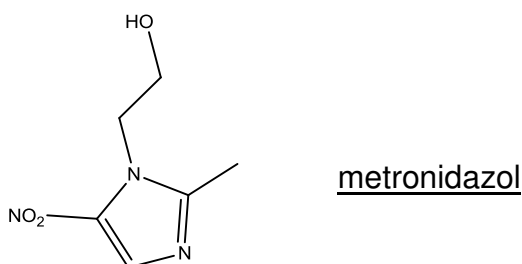
• ETHYLENDIAMINY

Zástupci této skupiny látek jsou strukturálně [1,2]-ethylendiaminová analoga ethambutolu, prvotního ethylendiaminového antituberkulotika. [68] Látka **SQ109** je v současnosti nejvýznamnějším zástupcem této skupiny, nachází se ve druhé fázi klinických studií s poměrně vysokým potenciálem do budoucna. [69] Mechanismus účinku SQ109 nebyl dosud konkrétně popsán, předpokládán je však odlišný mechanismus účinku od zatím publikovaných, založený na inhibici biosyntézy buněčné stěny mykobaktérií. [59; 70] Ačkoliv se jedná o analog ethambutolu, nebyla prokázána mykobakteriální skřížená rezistence mezi SQ109 a ethambutolem, což odlišný mechanismus účinku potvrzuje. [68]

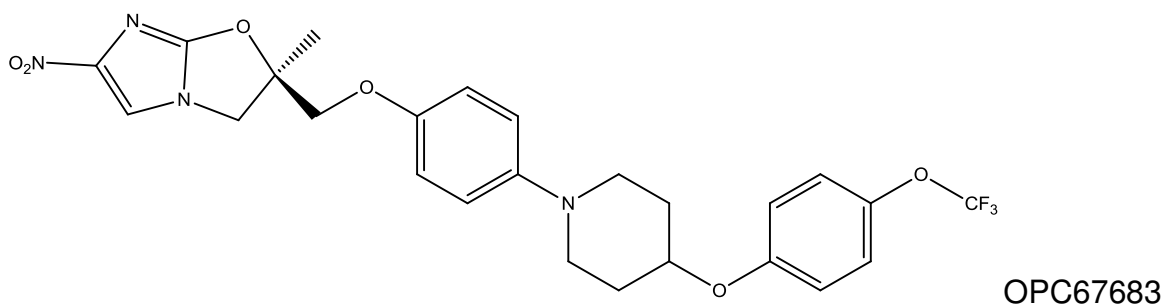
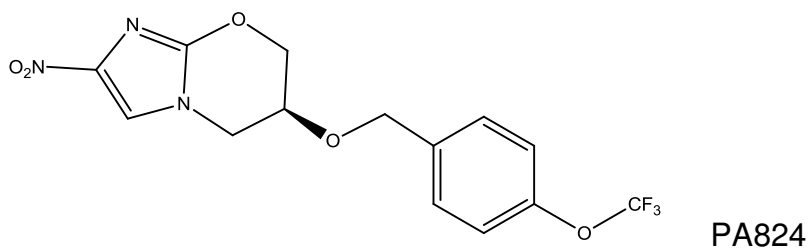


• NITROIMIDAZOLY

Nitroimidazoly jsou vzhledem k základu své struktury popisovány jako rozšířené analogy metronidazolu, chemoterapeutika s účinkem vůči protozoálním a anaerobním bakteriálním infekcím, zavedeného do praxe již v šedesátých letech minulého století, přičemž byla zvažována i jeho potencionální účinnost na dormantní stádia mykobaktérií. [59] V roce 1999 pak skupinou Brooks et al. [71] byla demonstrována i jeho mírná účinnost na mykobakteriální infekce, jak v samostatném podání, tak v kombinaci s isoniazidem, díky tomu pak byla syntetizovaná rozsáhlejší série jeho analog.



V současné době jsou mezi nitroimidazoly dvě hlavní testované molekuly nacházející se ve druhé fázi klinických studií, a to **PA824** (nitroimidazo-oxazine) a **OPC67683** (nitroimidazo-oxazol). [66] Předlohou vzniku těchto dvou látek byla molekula CGI-17341, u níž byla rovněž prokázána antimykobakteriální aktivita. Testování její anti-TBC aktivity však bylo brzy přerušeno po zjištění její výrazné mutagenní účinnosti. [59] U obou nových nitroimidazolových derivátů bylo potvrzené zachování jejich anti-TBC aktivity a vyvrácena možnost jejich mutagenního působení. [72] Jak PA824 tak OPC67683 jsou proléčivy, jejichž přeměna na aktivní formu je závislá na specifických mykobakteriálních enzýmech. [66; 73; 74] Konečným mechanismem účinku obou látek je pak inhibice biosyntézy lipidů buněčné stěny a inhibice proteosyntézy, způsobené redukcí nitro skupin na PA824 a OPC67683, čímž vznikají reaktivní dusíkaté intermediáty. [73; 74] U PA824 byla navíc prokázána účinnost jak v aerobním tak anaerobním prostředí, tedy inhibiční vliv i na dormantní stadia mykobaktérií, způsobený uvolněním oxidu dusnatého v intracelulárním prostředí. [59; 66; 75]

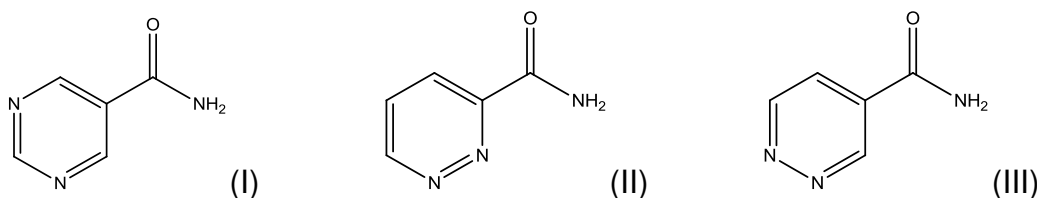


Další rozsáhlé spektrum nových potencionálních antituberkulotik různých struktur procházejících preklinickými studiemi (např. BDM31343, DNB1, BTZ043 ,DC-159a) nebo různými fázemi klinických studií je uvedeno v řadě přehledových článků, pro hlubší zájem např. [59; 66; 69].

3. Jednoduché chemické obměny struktury pyrazinu

– potencionální vývoj nových antituberkulotik

Brzy po nástupu pyrazinu (50. léta 20. století) jako antituberkulotika do běžné léčebné praxe, byla snaha vyvinout jeho další analoga s vyšší účinností. Ačkoliv je výzkum od této doby stále v běhu, doposud se nepodařilo syntetizovat analogum odpovídající daným požadavkům. Mezi první pokusy o vývoj účinnějších struktur patřila jednoduchá polohová isomerie pyrazinového jádra vedená Rogersem a kol. [76]. Jako základní obměny byly uvedeny tyto látky: pyrimidin-5-karboxamid (I), pyridazin-3-karboxamid (II) a pyridazin-4-karboxamid (III), přičemž ani u jedné látky nebyla zjištěna výhodnější aktivita, čímž byla zároveň prokázána důležitost pyrazinového jádra v jeho účinnosti.

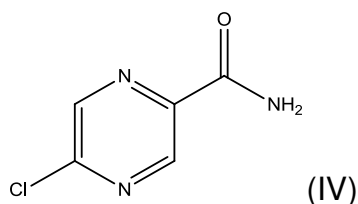


Další část této kapitoly se zabývá pouze stručným přehledem jednoduchých připravených analog pyrazinu.

3. 1. Substituce pyrazinového jádra

Z této řady je dosud za nejúčinnější látku považován 5-chlorpyrazin-2-karboxamid (5-Cl-PZA) publikovaný roku 1998 Cynamonem a kol. [77] *In vitro* aktivita 5-Cl-PZA (IV) byla výrazná jak u základního kmene *M. tuberculosis*, tak u méně častěji se vyskytujících jako: *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis* a *M. kansasii*, překvapivě pak i na rezistentní formu *M. tuberculosis* vůči PZA. Vzhledem k účinnosti

i na rezistentní formy mykobaktérií vznikl předpoklad možnosti rozdílného mechanismu účinku, než byl do té doby publikován u samotného PZA, což bylo brzy potvrzeno zjištěním, že 5-Cl-PZA působí jako inhibitor FAS I. I přes tuto stanovená fakta nebyla dosud publikována *in vivo* aktivita 5-Cl-PZA. V roce 2012 pak Sayahi a kol. publikovali, že v prováděných experimentálních měřeních byla potvrzena lepší afinita 5-Cl-PZA v kompetitivní vazbě na NADPH vazebné místo FAS I, než u nesubstituovaného PZA. [78]



Další jednoduché substituce pyrazinového jádra nejčastěji zahrnovaly zavedení amino- nebo hydroxylové skupiny do poloh 3, 5 a 6 [76], žádná z nově syntetizovaných struktur však nebyla publikována jako významně aktivní.

3. 2. Funkční deriváty karboxylových kyselin

- **jednoduché obměny karboxylové funkce**

Mezi základní jednoduché obměny karboxylové funkce spadá zejména příprava acylhalogenidů (nejčastěji acylchloridů) a anhydridů. Tyto skupiny jako účinné látky mají prakticky nulový potenciál, vzhledem k tomu, že se jedná o velmi silné reaktanty, čímž není možné jejich užití v léčebné praxi. Jejich využití je však vzhledem k silné reaktivitě výhodné pro syntézu dalších látek.

Samotné acylchloridy jako nejreaktivnější z acylhalogenidů jsou připravovány reakcí karboxylové kyseliny se silným činidlem, nejčastěji SOCl_2 , POCl_3 a PCl_5 (využití v metodické části této práce). [79] Ze vzniklého acylchloridu je pak možná, za přítomnosti karboxylové kyseliny a pyridinu (deprotonační činidlo), příprava anhydridů rovněž využitelných k dalším syntézám. Další základní metodou přípravy anhydridů je pak reakce dvou karboxylových kyselin za přítomnosti silného dehydratačního činidla (acetanhydrid, trifluoracetanhydrid, aj.). [79, 80]

- **estery pyrazinkarboxylové kyseliny**

Estery karboxylových kyselin jsou celkově ve farmaceutické chemii často využívaným postupem pro vznik lipofilnějších proléčiv dané účinné látky, které mají význam zejména pro zlepšení farmakokinetiky, respektive biologické dostupnosti léčiva. V 90. letech 20. století byla tato teorie využita týmem Cynamon a kol. [81; 82] i pro přípravu série esterů POA i jejich dalších derivátů. V *in vitro* testování byl u některých látek zjištěn výraznější nárůst účinku oproti PZA a dokonce i rozšíření antimykobakteriální aktivity na *M. avium* a *M. kansasii*. Avšak vzhledem k vysoké nestabilitě syntetizovaných produktů v lidské plazmě (rychlá biodegradace esterasami) není jejich praktické využití přínosné.

Základní příprava esterů karboxylových kyselin probíhá nejčastěji metodou esterifikace v kyselém prostředí (nejčastěji za přítomnosti H₂SO₄), nebo využitím výše zmíněných silnějších reaktantů jako acylchlorid nebo anhydridy – acylace alkoholů reaktivními činidly. [79; 80]

- **N-substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny**

V rámci této práce (vzhledem k experimentální části) stojí za zmínění zejména fenylem N-substituované deriváty PZA neboli anilidy kyseliny pyrazin-2-karboxylové, které jsou již řadu let hlavním cílem syntézy nových potencionálních antituberkulotik na KFChKL Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Prof. Doležalem a jeho kolektivem bylo připraveno již přes sto různých anilidů substituovaných na fenylovém i pyrazinovém jádru. U několika z nich byla pak zaznamenána významná MIC (6,25 µg/ml) vůči růstu *M. tuberculosis*. Pro zájemce je zde uveden odkaz na hlubší tematiku v souhrnu použité literatury: [83; 84; 85] Základní jednoduchý postup přípravy těchto látek je uveden v metodické části této práce.

Mezi další významnější deriváty N-substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny jsou řazena např. aminomethylenová analoga [86; 87] a N-substituované amidy POA. [88] U některých z těchto syntetizovaných látek byla zaznamenána povzbudivá *in vitro* aktivita vůči *M. tuberculosis*, avšak prozatím u žádné z nich nebyla publikována jejich *in vivo* účinnost.

V. Experimentální část

4. Použité chemikálie, přístroje a analytické metody

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

Pro sledování a kontrolu průběhu syntetických reakcí a ověření čistoty produktů byla použita metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako mobilní fáze byla využita soustava typu: toluen:ethyl-acetát (9:1) nebo hexan:ethyl-acetát (3:1). Vlastní analýza byla provedena na TLC deskách Merck (Darmstadt, Německo), Silica gel 60 F₂₅₄. Detekce výsledků TLC byla prováděna pod UV lampou emitující záření o vlnové délce 254 nm.

U chemikálií, použitých u dále uvedených reakcí, byly ověřeny základní fyzikální konstanty. Rozpouštědlo pro přípravu VL, konkrétně bezvodý toluen, bylo řádně vyčištěno a vysušeno. Pro přípravu finálních syntetizovaných produktů byl použit běžný, komerčně dostupný bezvodý aceton.

Nově syntetizované produkty byly separovány pomocí preparativního chromatografu CombiFlash[®] Rf (Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA), stacionární fáze silikagel, gradientová eluce 0-30 % EtOAc v hexanu, detekční vlnová délka 280 nm. Teplota tání čistého produktu byla stanovena v otevřené kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP30 (Bibby Sterling STD, UK). Hodnoty jsou nekorigované.

Totožnost připravených látek byla ověřována pomocí analýzy ¹H-NMR a ¹³C-NMR spekter na Katedře anorganické a organické chemie (KAOCH) za využití spektrometru Varian Mercury VX-BB 300 a Varian VNMR S500 (Varian Corp., Palo Alto, CA, USA). Spektra byla zaznamenána v deuterovaném CDCl₃ nebo DMSO při laboratorní teplotě a frekvenci 300 MHz pro ¹H a 75 MHz pro ¹³C, respektive 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C za pomoci doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) pomocí signálu rozpouštědla.

Infračervená spektra připravených látek byla získána metodou zeslabené totální reflektance (ATR) na Ge krystalu na přístroji Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) rovněž na KAOCH.

Elementární analýza byla provedena na přístroji CE Instruments EA-1110 CHN analyser (CE Instruments, Wigan, United Kingdom). Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v procentech.

Veškeré chemické vzorce byly vytvořeny pomocí programu ChemDraw Ultra, verze 12.0.2 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA). Ke zjištění míry lipofility získaných sloučenin byly vypočteny jejich $\log P$ a $\text{Clog } P$ pomocí programu CS ChemDraw Ultra ver. 12.0. (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Praktické výtěžky se vztahují k chromatograficky čistému produktu.

5. Experimentální měření lipofility

Experimentální hodnoty lipofility byly změřeny pomocí kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 SL s detektorem diodového pole SL G1315C (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA) na Katedře fyzikální chemie Ing. Vladimírem Kubíčkem, CSc. Na měření byla použita předkolona ZORBAX XDB-C18 5 μm , 4x4 mm, Part No. 7995118-504 (Agilent Technologies Inc.), jako kolona pak ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μm , 4,6x200 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc.). K monitorování procesu rozdělávání byl použit software Agilent ChemStation (verze B.04.02), zahrnující spektrální modul (Agilent Technologies Inc.). Jako mobilní fáze byla využita směs methanolu (70 %) a vody (30 %). Pro samotný experiment byly pak nastaveny následující parametry: průtok kolonou 1,0 ml/min, nástřik vzorku 20 μl , teplota kolony 30 °C, detekce při vlnové délce 210 nm a nastavení monitorovací vlnové délky 270 nm. Retenční čas (t_R) byl měřen v minutách. Kapacitní faktor k byl poté vypočten dle vzorce $k = (t_R - t_D)$, kde t_R je retenční čas dané látky a t_D mrtvý čas kolony měřený jako retenční čas methanolického roztoku jodidu draselného (KI). $\log k$ je dekadickým logaritmem kapacitního faktoru k .

6. Biologická hodnocení připravených látek: postupy

6. 1. Testování antimykobakteriální aktivity

Antimykobakteriální aktivita byla testována pomocí mikrodiluční metody na mikrotitračních destičkách s vizuálním odečtem výsledků na Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové MUDr. Pavlou Paterovou. Syntetizované produkty byly *in vitro* testovány na aktivitu vůči těmto kmenům: *M. avium* spp. *avium* Chester CNCTC My 80/72, *M. avium* CNTC My 152/73, *M. kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 a *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88. Uvedené mykobakteriální kmeny byly zakoupeny od České národní sbírky typových kultur (CNCTC) při Státním zdravotním ústavu. Sloučeniny byly rozpuštěny a naředěny dvojkovým ředěním v DMSO a smíseny s růstovým médiem Šulovou půdou o pH = 5,6 (Trios, Praha) na konečné koncentrace: 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 µg/ml. Mykobakteriální suspenze byly dále upraveny pro každý jednotlivý kmen naředěním na 10^{-1} a 10^{-3} (získány ze suspenze o hodnotě 0,5 – 1,0 McFalandovy stupnice), načež následovala inokulace mikrotitračních destiček. Všechny zkoumané látky byly testovány dvakrát a to při dvou různých koncentracích mykobakteriální suspenze. Kultivace testovaných mykobaktérií probíhala v inkubátoru při teplotě 36 ± 1 °C a to po dobu 10 – 14 dnů, dokud nárůst mykobaktérií v kontrolní jamce nebyl dostatečný. Minimální inhibiční koncentrace (MIC, µg/ml) byla odečtena jako nejnižší koncentrace testované látky, která je schopna inhibovat viditelný růst mykobaktérií. Pokud se odečtené hodnoty MIC pro ředění 10^{-1} a 10^{-3} navzájem lišily o více než jeden krok dvojkového ředění, testování bylo opakováno. Jako standardy byly při testování použity PZA a INH. Látky, u nichž byla při testování zjištěna významná mykobakteriální aktivita (MIC = 1,56 - 3,13 µg/ml), byly nadále testovány shodnou metodou při nižších koncentracích. A to v řadě: 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 – 0,78 – 0,39 µg/ml). Jako standard byl použit INH.

6. 2. Testování antifungální aktivity

Antifungální aktivita připravených látek byla testována *in vitro* na Katedře lékařských a biologických věd (p. Iduou Dufkovou) za použití mikrodilučního bujónového testu, konkrétně vůči *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida*

tropicalis 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigelii* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC) a *Trichosporon mentagrophytes* 445 (TM). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny v MHB médiu nebo RPMI 1640 médiu s glutaminem. Koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesahovala 2,5 % (v/v) celkového složení roztoku. Pomocí kontroly bylo ověřeno, že tato koncentrace DMSO neovlivňovala růst testovaných hub. Statický způsob inkubace byl proveden v glutaminovém médiu při pH = 7 v humidní atmosféře při 35 °C. Délka průběhu inkubace byla 24 – 48 hodin (u TM 48 – 72 hodin). Standardy při testování byly flukonazol (FLU) a amfotericin B (AMB).

6. 3. Testování antibakteriální aktivity

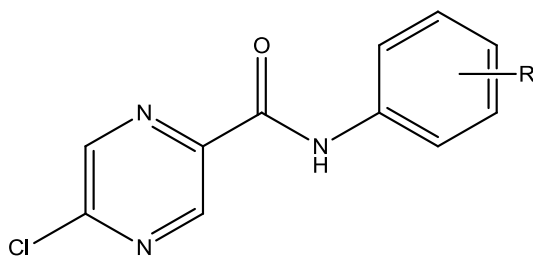
Antibakteriální aktivita připravených látek byla testována *in vitro* metodou mikrodilučního bujónového testu. Některé bakteriální kmeny použité pro testování, doporučené jako standardy pro výzkum antibakteriální aktivity, byly získány od České sbírky mikroorganismů (CCM) Masarykovy univerzity v Brně. Jedná se o: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Další kmeny vhodné pro test byly klinické izoláty: *Staphylococcus aureus* H 5996/08 – meticilin rezistentní (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus spp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní, pocházející z Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Všechny uvedené zkoušené kmeny byly vykultivovány na Mueller-Hintonovu agaru při teplotě 35 °C a následně udržovány na stejném médiu při 4 °C. Vypěstovaná bakteriální inokula byla nadále suspendována ve sterilním 0,85 % solném roztoku – hustota suspenze byla upravena na 0,5 dle McFarlanda. Připravená suspenze byla poté použita k inokulaci. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO. Jejich aktivita byla stanovována v Mueller-Hintonovu bujónu při pH = 7,0; přičemž koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesahovala 1 % (v/v) celkového složení roztoku (pomocí kontrol bylo prokázáno, že uvedená koncentrace DMSO v testovacím médiu neovlivňuje růst bakterií). Hodnota MIC (=> 95 % inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s kontrolním vzorkem) byla odečítána po 24 a 48 hodinách statické inkubace při teplotě 35 °C. Jako standardy byly použity penicilin G (PEN), ciprofloxacin HCC (CIP) a fenoxymethylpenicilin (PHE).

7. Experimentální měření cytotoxicity

Měření buněčné toxicity testovaných látek bylo provedeno na Katedře farmakologie a toxikologie Mgr. Janou Mandíkovou na buněčné linii lidských jaterních buněk HepG2 pořízených z Health Protection Agency Culture Collection (ECACC, Salisbury, UK), které byly rutinně kultivovány v médiu Minimum Essentials Eagle Medium (MEM, Sigma-Aldrich) doplněném 10 % fetálním bovinním sérem (PAA, Biotech, Praha), 1 % roztokem L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a roztokem neesenciálních mastných kyselin (Sigma-Aldrich). Vše probíhalo v humidní 5 % CO₂ atmosféře při teplotě 37 °C. Buňky získané po úpravě v roztoku trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) při teplotě 37 °C a poté nadále upravené testovanými látkami byly použity jako experimentální skupiny. Buňky HepG2 bez nanesení testovaných látek byly použity jako skupiny kontrolní.

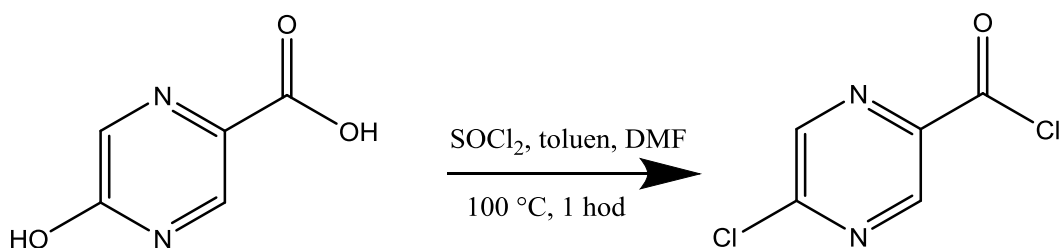
Při samotném experimentu byly buňky nasazeny v hustotě 1×10^4 buněk na jamku do 96-jamkové titrační destičky. Další den byly k buňkám přidány upravené testované látky, předem rozpuštěné v DMSO a naředěné tak, aby konečný roztok obsahoval méně než 1 % DMSO v médiu. Testované sloučeniny byly pro inkubaci připraveny v koncentracích 0-100 μM (v deseti různých koncentracích) v triplicátech pro každou koncentraci. Dále byly připraveny následující kontroly: kontrola pro stanovení 100 % viability, kontrola pro stanovení nulové viability (působením 10 % DMSO), kontrola pro stanovení případné interakce testovaných látek s příslušným reagens a kontrola pozadí inkubačního média. Po 24 hodinách inkubace bylo do jamek s buňkami a testovanou látkou přidáno reagens použitého kitu. Po dalších 2 hodinách inkubace v humidní 5 % CO₂ atmosféře při 37 °C byla pomocí destičkového analyzátoru zaznamenána absorbance při vlnové délce 490 nm. Standardní toxikologický parametr IC₅₀ byl vypočítán u každé z testovaných látek pomocí programu GraphPad Prism software (verze 5.02.).

8. Postup přípravy finálních produktů:



300 mg (2,14 mmol) kyseliny 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové bylo dispergováno ve 30 ml bezvodého toluenu s následným přidavkem 1,0 ml (14 mmol) thionylchloridu (SOCl_2) a 3 kapek bezvodého DMF jako katalyzátoru. [89] Směs byla zahřívána na olejové lázni pod zpětným chladičem při teplotě $100\text{ }^\circ\text{C}$ (nastaveno termostatem) po dobu 60 minut. Během reakce směs tmavla a výchozí látka se rozpouštěla. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po skončení reakce byla reakční směs ponechána mírně vychladnout. Poté byla rozpouštědla oddestilována za sníženého tlaku a zbytky SOCl_2 byly odstraněny opakovanou destilací s bezvodým toluenem za sníženého tlaku (3x 20 ml toluenu). Zbytek po destilaci ve formě hnědo-červené husté kapaliny byl bez dalšího čištění použit do dalšího kroku reakce.

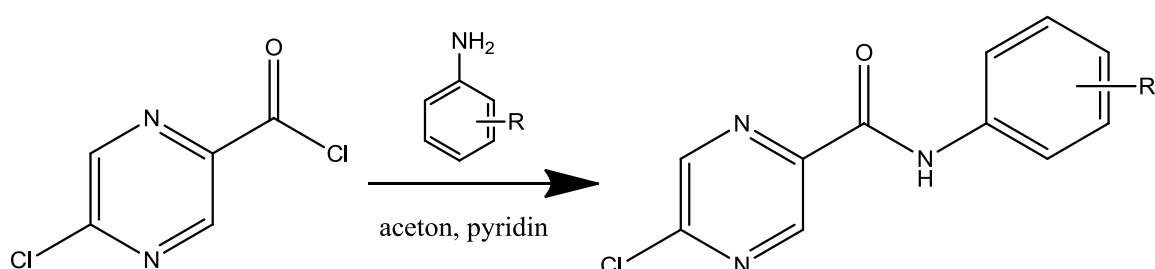
Reakční schéma:



Vzniklý chlorid 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (červenohnědá kapalina) byl naředěn přibližně 20 ml bezvodého acetonu. Dále byl připraven roztok příslušného substituovaného anilinu (0,8 molární ekvivalenty vůči výchozí 5-OH-POA) s pyridinem (pro navázání zbylého chloridu, 2,0 molární ekvivalenty) naředěných rovněž ve 20 ml bezvodého acetonu. Roztok chloridu kyseliny byl po částech přikapán do roztoku anilinu s pyridinem. V průběhu přidavku se reakční směs mírně zahřívala a počala vypadávat sraženina. Reakční směs byla míchána

zhruba dvě hodiny s kontrolou průběhu reakce pomocí TLC a následně ponechána k odstání do druhého dne. Rozpouštědla byla oddestilována za sníženého tlaku, případný zbytek pyridinu byl odstraněn azeotropní destilací s toluenem za sníženého tlaku. Suchý pevný zbytek byl poté opětovně rozpuštěn v acetonu, naadsorbován na silikagel a odseparován prostřednictvím preparativního chromatografu CombiFlash® Rf (silikagel, 10-30 % (V/V) ethyl-acetátu v hexanu). Frakce obsahující cílový produkt byly spojeny a rozpouštědla byla oddestilována na rotační odparce za sníženého tlaku.

Reakční schéma:

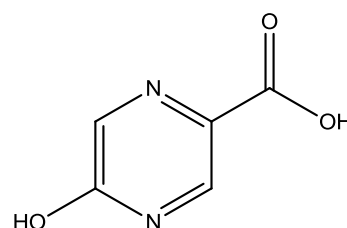


R=3-Br; 3-F; 3-Cl, 4-Cl; 2-OH; 3-OH; 4-OH; 3-CF₃; 4-CF₃; 2-Cl, 4-Cl, 5-Cl; 3-OH, 4-COOH; 4-isopropyl, -H (bez substituentu)

9. Výchozí látky

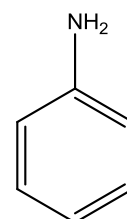
5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C₅H₄N₂O₃
- molekulová hmotnost: 140,10 g/mol
- log *P*: -0,33
- Clog *P*: 0,732



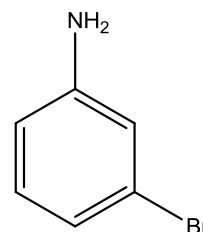
anilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C₆H₇N
- molekulová hmotnost: 93,13 g/mol
- log *P*: 0,90
- Clog *P*: 0,915



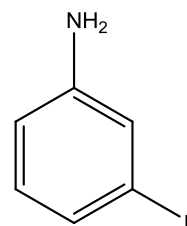
3-bromanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C_6H_6BrN
- molekulová hmotnost: 172,02 g/mol
- log P : 2,06
- Clog P : 2,058



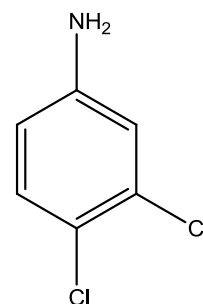
3-fluoranilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C_6H_6FN
- molekulová hmotnost: 111,12 g/mol
- log P : 1,30
- Clog P : 1,338



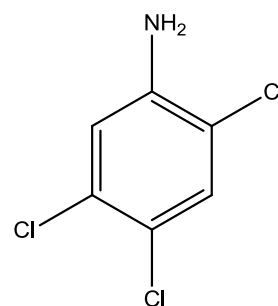
3,4-dichloranilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_6H_5Cl_2N$
- molekulová hmotnost: 160,02 g/mol
- log P : 2,74
- Clog P : 2,599



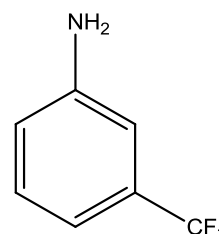
2,4,5-trichloranilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_6H_4Cl_3N$
- molekulová hmotnost: 196,46 g/mol
- log P : 2,91
- Clog P : 3,346



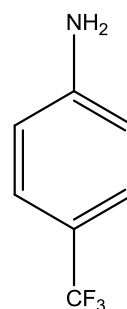
3-trifluormethylanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_7H_6F_3N$
- molekulová hmotnost: 161,12 g/mol
- log P : 2,15
- Clog P : 2,288



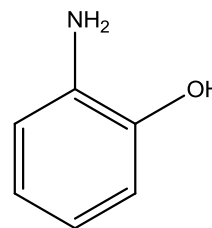
4-trifluormethylanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_7H_6F_3N$
- molekulová hmotnost: 161,12 g/mol
- log P : 2,15
- Clog P : 2,288



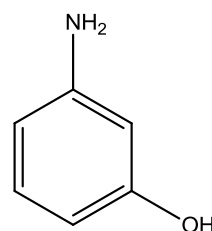
2-hydroxyanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C_6H_7NO
- molekulová hmotnost: 109,13 g/mol
- log P : 0,58
- Clog P : 0,618



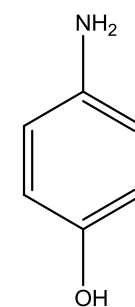
3-hydroxyanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C_6H_7NO
- molekulová hmotnost: 109,13 g/mol
- log P : 0,20
- Clog P : 0,248



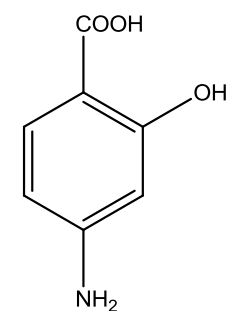
4-hydroxyanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: C_6H_7NO
- molekulová hmotnost: 109,13 g/mol
- log P : 0,84
- Clog P : 0,248



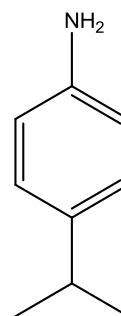
4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_7H_7NO_3$
- molekulová hmotnost: 153,14 g/mol
- log P : 0,40
- Clog P : 1,056



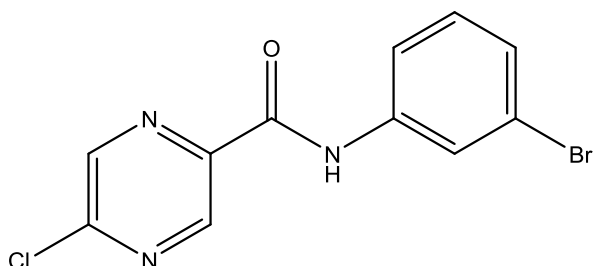
4-isopropylanilin (Sigma-Aldrich)

- sumární vzorec: $C_9H_{13}N$
- molekulová hmotnost: 135,21 g/mol
- log P : 2,47
- Clog P : 2,342



10. Nově připravené látky – finální produkty

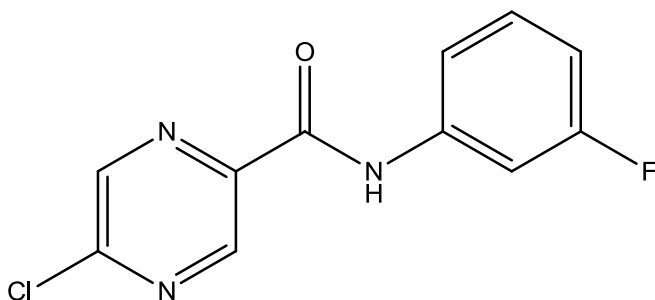
- ***N*-(3-bromfenyl)-5-chlorpyrazin-2-karboxamid**
(označení: **SL XI**)



- sumární vzorec: C₁₁H₇BrClN₃O
- molekulová hmotnost: 312,55 g/mol
- vzhled: bílá pevná látka
- log *k*: 0,6456
- log *P*: 2,32
- Clog *P*: 3,085
- IC₅₀: nedostupné, SI: nedostupné
- teplota tání: 135,3-136,0 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 668,9 mg
 - praktická: 378,6 mg, (56,6 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3360 ν(NH; -CO-NH-); 1693 ν(C=O, -CONH-); 1586; 1521; 1455; 1421; 1273; 1251; 1135; 1024; 906; 788; 776; 681
- ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): d 9.48 (1H, bs, NH), 9.26 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H3), 8.58 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H6), 7.99 (1H, t, *J*=2.0 Hz, H2'), 7.65 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H6'), 7.32 (1H, d, *J*=8.1 Hz, H4'), 7.26 (1H, t, *J*=8.1 Hz, H5')
- ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): d 159.8, 152.6, 144.3, 142.4, 142.2, 138.2, 130.5, 128.0, 122.8, 122.8, 118.3
- elementární analýza: vypočteno: C, 42.27 %; H, 2.26 %; N, 13.44 %; nalezeno: C, 41.93 %; H, 2.07 %; N, 13.28 %.

- **5-chlor-*N*-(3-fluorfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

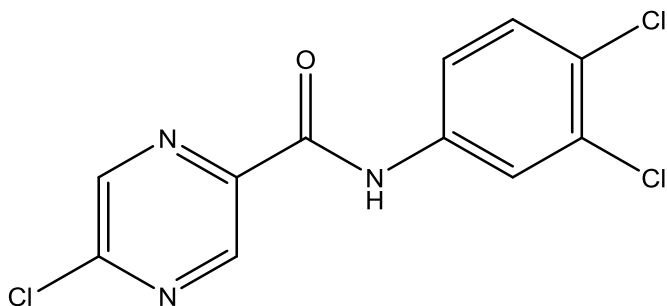
(označení: **SL XIV**)



- sumární vzorec: C₁₁H₇ClFN₃O
- molekulová hmotnost: 251,64 g/mol
- vzhled: bílá až lehce béžová pevná látka
- log *k*: 0,3888
- log *P*: 1,65
- Clog *P*: 2,365
- teplota tání: 144,5-145,5 °C
- IC₅₀: nedostupné, SI: nedostupné
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 538,5 mg
 - praktická: 301,56 mg (56,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3364 ν(NH; -CO-NH-); 1679 ν(C=O, -CONH-); 1616; 1532; 1442; 1273; 1153; 1132; 1024; 875; 785; 682; 663
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 9.53 (1H, bs, NH), 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.58 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 7.74-7.67 (1H, m, H2'), 7.42-7.29 (2H, m, H5', H6'), 6.94-6.84 (1H, m, H4')
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 163.0 (d, *J*=245.4 Hz), 159.9, 152.6, 144.3, 142.4, 142.2, 138.4 (d, *J*=10.9 Hz), 130.3 (d, *J*=9.4 Hz), 115.2 (d, *J*=3.2 Hz), 111.8 (d, *J*=21.4 Hz), 107.4 (d, *J*=26.6 Hz)
- elementární analýza: vypočteno: C, 52.50 %; H, 2.80 %; N, 16.70 %; nalezeno: C, 52.33 %; H, 2.84 %; N, 16.55 %.

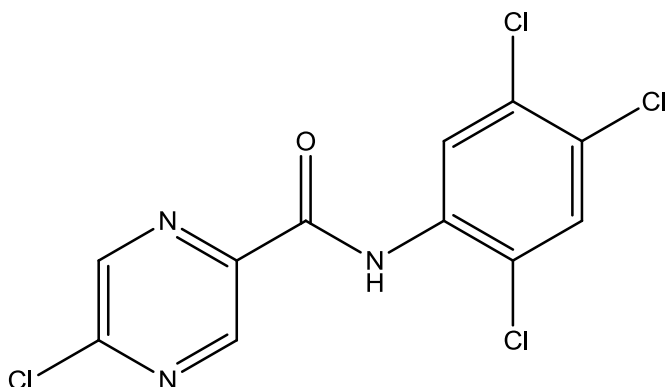
- **5-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

(označení: **SL XIII**)



- sumární vzorec: C₆H₁₁Cl₃N₃O
- molekulová hmotnost: 302,54 g/mol
- vzhled: bílá pevná látka
- log *k*: 0,8807
- log *P*: 2,61
- Clog *P*: 2,683
- IC₅₀: 9,10 μmol/l, SI: 0,88 μg/ml
- teplota tání: 185,5-186,9 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 647,4 mg
 - praktická: 563,2 mg (87,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3354 ν(NH; -CO-NH-); 2360; 2342; 1692 ν(C=O, -CONH-); 1578; 1520; 1478; 1463; 1458; 1388; 1133; 1024; 919; 882; 824; 668
- ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.49 (1H, bs, NH), 9.25 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.57 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H6), 7.97 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H2'), 7.57 (1H, dd, *J*=8.7, 2.6 Hz, H6'), 7.44 (1H, d, *J*=8.7 Hz, H5')
- ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 159.87, 152.77, 144.25, 142.43, 141.95, 136.40, 133.08, 130.74, 128.29, 121.49, 119.01
- elementární analýza: vypočteno: C, 43.67 %; H, 2.00 %; N, 13.89 %; nalezeno: C, 43.81 %; H, 2.24%; N, 14.03 %.

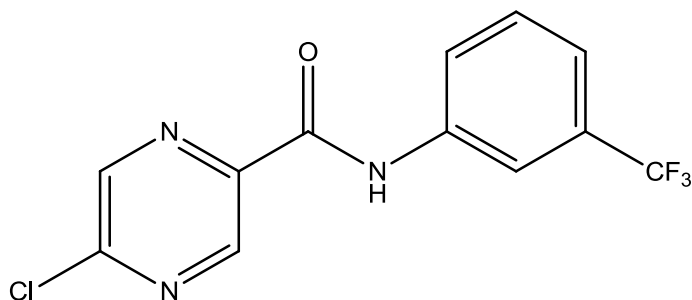
- **5-chlor-*N*-(2,4,5-trichlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid**
(označení: **JZ 63**)



- sumární vzorec: C₁₁H₅Cl₄N₃O
- molekulová hmotnost: 336,99 g/mol
- vzhled: bílá pevná látka
- log *k*: nedostupné
- log *P*: 3,16
- Clog *P*: 3,398
- IC₅₀: nedostupné, SI: nedostupné
- teplota tání: 189,3-192,4 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 721,2 mg
 - praktická: 403,9 mg (56,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3332 ν(NH; -CO-NH-); 2360; 2342; 1690 ν(C=O, -CONH-); 1574; 1511; 1459; 1366; 1258; 1143; 1074; 1022; 901; 887; 669
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 10.13 (1H, bs, NH), 9.25 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H3), 8.82 (1H, s, H3'), 8.63 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H6), 7.54 (1H, s, H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 160.0, 153.0, 144.3, 142.8, 141.9, 133.3, 132.1, 130.1, 128.1, 122.0, 121.9
- elementární analýza: vypočteno: C, 39.21 %; H, 1.50 %; N, 12.47 %; nalezeno: C, 39.49 %; H, 1.57 %; N, 12.42 %.

- **5-chlor-*N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

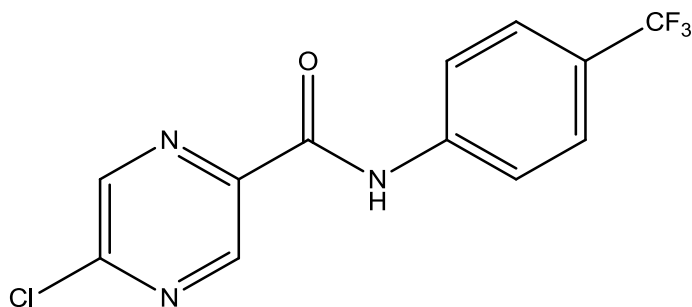
(označení: **SL XIX**)



- sumární vzorec: C₁₂H₇ClF₃N₃O
- molekulová hmotnost: 301,65 g/mol
- vzhled: bílá pevná látka
- log *k*: 0,6432
- log *P*: 2,41
- Clog *P*: 3,128
- IC₅₀: 41,39 μmol/l, SI: 3,99 μg/ml
- teplota tání: 121,5-122,5 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 645,5 mg
 - praktická: 458,3 mg (71,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3367 ν(NH; -CO-NH-); 2359; 1686 ν(C=O, -CONH-); 1608; 1544; 1453; 1340; 1325; 1136; 1119; 1071; 1024; 918; 903; 802; 699; 660
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 9.60 (1H, bs, NH), 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.59 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 8.03 (1H, bs, H2'), 7.95 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H4'), 7.52 (1H, t, *J*=8.0 Hz, H5'), 7.44 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 160.1, 152.8, 144.3, 142.5, 142.1, 137.5, 131.7 (q, *J*=32.4 Hz), 129.8, 123.7 (q, *J*=272.6 Hz), 122.9, 121.6 (q, *J*=3.7 Hz), 116.6 (q, *J*=4.0 Hz)
- elementární analýza: vypočteno: C, 47.78 %; H, 2.34 %; N, 13.93 %; nalezeno: C, 47.95 %; H, 2.42 %; N, 13.80 %.

- **5-chlor-*N*-(4-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

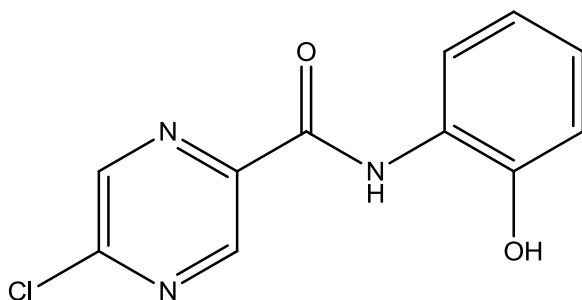
(označení: **JZ 83**)



- sumární vzorec: C₁₂H₇ClF₃N₃O
- molekulová hmotnost: 301,65 g/mol
- vzhled: bílá pevná látka
- log *k*: 0,7035
- log *P*: 2,41
- Clog *P*: 3,128
- IC₅₀: 8,50 μmol/l, SI: 1,64 μg/ml
- teplota tání: 179,8-181,1 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 644,6 mg
 - praktická: 503,5 mg (78,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3372 ν(NH; -CO-NH-); 2359; 1690 ν(C=O, -CONH-); 1530; 1412; 1322; 1315; 1162; 1143; 1119; 1066; 1028; 902; 846; 666
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 9.63 (1H, bs, NH), 9.28 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H3), 8.59 (1H, d, *J*=1.2 Hz, H6), 7.90-7.84 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.69-7.62 (2H, m, AA', BB', H2', H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 160.1, 152.8, 144.3, 142.4, 142.1, 140.0, 126.8 (q, *J*=32.9 Hz), 126.5 (q, *J*=4.0 Hz), 123.9 (q, *J*=271.7 Hz), 119.5
- elementární analýza: vypočteno: C, 47.78 %; H, 2.34 %; N, 13.93 %; nalezeno: C, 47.58 %; H, 2.28 %; N, 13.71 %.

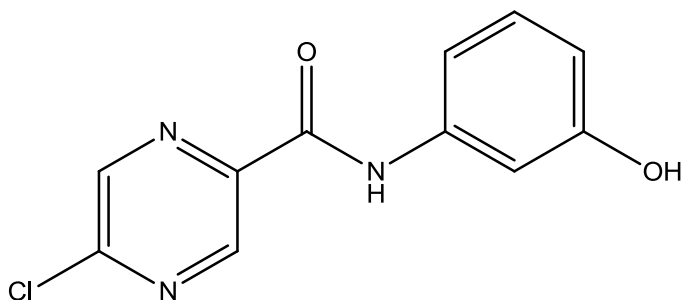
- **5-chlor-*N*-(2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

(označení: **JZ 89**)



- sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O₂
- molekulová hmotnost: 249,65 g/mol
- vzhled: slabě žlutá práškovitá látka
- log *k*: 0,2483
- log *P*: 1,10
- Clog *P*: 1,769
- IC₅₀: 30,00 μmol/l, SI: 2,39 μg/ml
- teplota tání: 220,9-221,6 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 356,4 mg
 - praktická: 164,0 mg (46,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3319 ν(NH; -CO-NH-); 3090; 1655 ν(C=O, -CONH-); 1551; 1454; 1373; 1314; 1284; 1241; 1150; 1116; 1020; 907; 856; 758; 699
- ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 10.35 (1H, s, OH), 10.07 (1H, bs, NH), 9.13-9.11 (1H, m, H3), 8.95-8.93 (1H, m, H6), 8.28 (1H, dd, *J*=8.0 Hz, *J*=1.4 Hz, H3'), 7.02-6.81 (3H, m, H4', H5', H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 159.5, 151.4, 146.9, 143.6, 143.4, 143.1, 125.8, 124.9, 119.6, 119.5, 115.0
- elementární analýza: vypočteno: C, 52.92 %; H, 3.23 %; N, 16.83 %; nalezeno: C, 53.01 %; H, 3.40 %; N, 16.98 %.

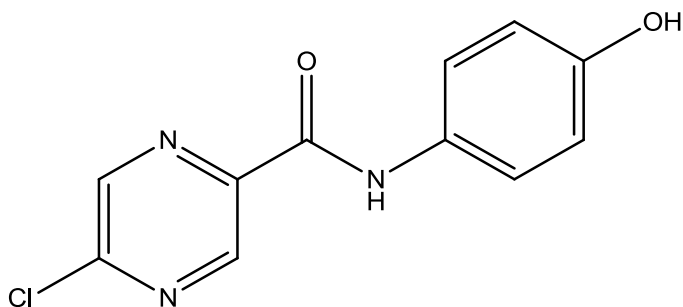
- **5-chlor-*N*-(3-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid**
(označení: **SL XVI**)



- sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O₂
- molekulová hmotnost: 249,65 g/mol
- vzhled: pevná nažloutlá látka
- log *k*: -0,0529
- log *P*: 1,10
- Clog *P*: 1,539
- IC₅₀: 32,10 μmol/l, SI: 1,28 μg/ml
- teplota tání: 225,1-226,3 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 534,3 mg
 - praktická: 208,4 mg (39,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3318 ν(NH; -CO-NH-); 3268; 1682; 1666 ν(C=O, -CONH-); 1615; 1544; 1451; 1279; 1196; 1137; 1116; 1022; 895; 784; 685
- ¹H NMR (300 MHz, DMSO): d 10.63 (1H, bs, NH), 9.53 (1H, s, OH), 9.16 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.98 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 7.50 (1H, t, *J*=2.1 Hz, H2'), 7.34-7.28 (1H, m, H4'), 7.19 (1H, t, *J*=8.1 Hz, H5'), 6.65-6.57 (1H, m, H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): d 160.9, 157.7, 151.0, 144.2, 144.2, 143.1, 139.2, 129.5, 111,7, 111.6, 107.8
- elementární analýza: vypočteno: C, 52.92 %; H, 3.23 %; N, 16.83 %; nalezeno: C, 53.13 %; H, 3.22 %; N, 16.72 %.

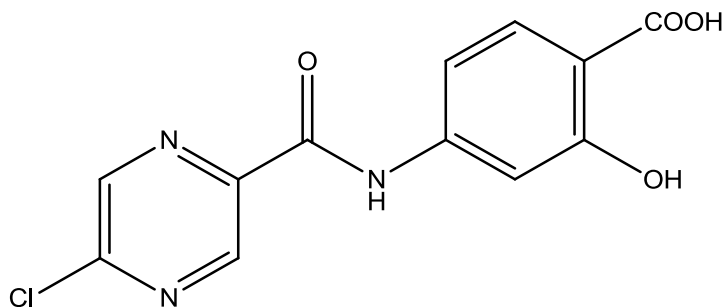
- **5-chlor-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid**

(označení: **SL XVII**)



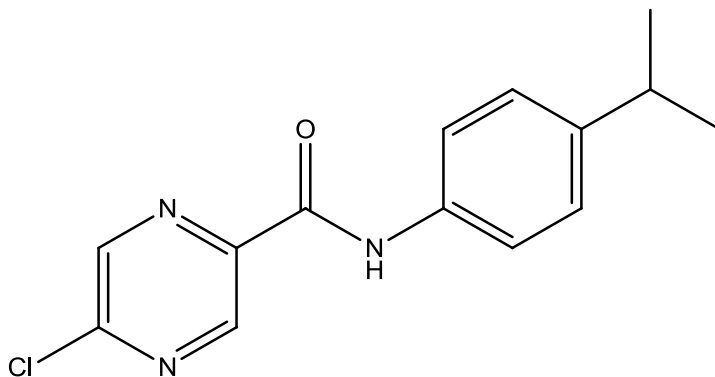
- sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O₂
- molekulová hmotnost: 249,65 g/mol
- vzhled: žlutá pevná látka
- log *k*: -0,1379
- log *P*: 1,10
- Clog *P*: 1,539
- IC₅₀: 68,60 μmol/l, SI: 5,47 μg/ml
- teplota tání: 204,8-206,7 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 534,3 mg
 - praktická: 240,4 mg (45,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3339 ν(NH; -CO-NH-); 3291; 1689 ν(C=O, -CONH-); 1639; 1602; 1554; 1510; 1444; 1264; 1219; 1142; 1115; 1026; 901; 836; 809; 668
- ¹H NMR (300 MHz, DMSO): d 10.49 (1H, bs, NH), 9.32 (1H, s, OH), 9.06 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.87 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 7.67-7.58 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.77-6.69 (2H, m, AA', BB', H3', H5')
- ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): d 160.4, 154.4, 150.9, 144.3, 144.0, 143.0, 129.8, 122.5, 115.2
- elementární analýza: vypočteno: C, 52.92 %; H, 3.23 %; N, 16.83 %; nalezeno: C, 53.07 %; H, 3.11 %; N, 16.57 %.

- **kyselina 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamid)-2-hydroxybenzoová**
(označení: **JZ 94**)



- sumární vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₄
- molekulová hmotnost: 293,66 g/mol
- vzhled: lehce nažloutlá pevná látka
- log k: nedostupné
- log P: 0,66
- Clog P: 2,246
- IC₅₀: nedostupné, SI: nedostupné
- teplota tání: 240,0-244,0 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 628,8 mg
 - praktická: 113,0 mg (18,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3389 ν(NH; -CO-NH-); 1694 ν(C=O, -CONH-); 1600; 1133; 1024; 785
- ¹H NMR (300 MHz, DMSO): d 10.62 (1H, bs, NH), 9.09 (1H, d, *J*=1.1 Hz, H3), 8.91 (1H, d, *J*=1.1 Hz, H6), 7.66 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H5'), 7.36 (1H, d, *J*=2.1 Hz, H2'), 7.21 (1H, dd, *J*=8.5 Hz, *J*=2.1 Hz, H6')
- ¹³C NMR (75 MHz, DMSO): d 171.9, 163.0, 161.2, 151.1, 145.4, 144.3, 144.1, 143.1, 130.6, 109.6, 107.6
- elementární analýza: vypočteno: C, 49.08 %; H, 2.75 %; N, 14.31 %; nalezeno: C, 48.86 %; H, 2.79 %; N, 14.17 %.

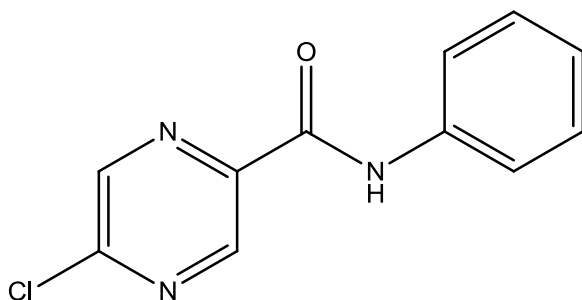
- **5-chlor-*N*-(4-isopropylfenyl)pyrazin-2-karboxamid**
(označení: **SL XVIII**)



- sumární vzorec: C₁₄H₁₄ClN₃O
- molekulová hmotnost: 275,73 g/mol
- vzhled: bílé šupinaté krystaly
- log *k*: 0,8588
- log *P*: 2,72
- Clog *P*: 3,633
- IC₅₀: 14,44 μmol/l, SI: 2,55 μg/ml
- teplota tání: 151,1-152,8 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 590,1 mg
 - praktická: 259,6 mg (44,0 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3360 ν(NH; -CO-NH-); 2959 ν(CH₃); 2360; 1677 ν(C=O, -CONH-); 1594; 1518; 1415; 1310; 1134; 1021; 902; 831; 660
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 9.44 (1H, bs, NH), 9.27 (1H, d, *J*=1.0 Hz, H₃), 8.57 (1H, d, *J*=1.0 Hz, H₆), 7.69-7.61 (2H, m, AA', BB', H₂', H₆'), 7.30-7.22 (2H, m, AA', BB', H₃', H₅'), 3.01-2.83 (1H, m, CH), 1.26 (6H, d, *J*=6.9 Hz, CH₃)
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 159.6, 152.2, 145.8, 144.2, 142.7, 142.3, 134.7, 127.1, 119.9, 33.6, 24.0
- elementární analýza: vypočteno: C, 60.99 %; H, 5.12 %; N, 15.24 %; nalezeno: C, 61.11 %; H, 5.27 %; N, 15.41 %.

- **5-chlor-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid**

(označení: **JZ 90**)



- sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O
- molekulová hmotnost: 233,65 g/mol
- vzhled: bílá krystalická látka
- log *k*: 0,2860
- log *P*: 1,49
- Clog *P*: 2,206
- IC₅₀: 2,55 μmol/l, SI: 0,19 μg/ml
- teplota tání: 157,2-158,1 °C
- výtěžnost reakce:
 - teoretická: 333,5 mg
 - praktická: 143,0 mg (42,9 %)
- IR spektrum (ATR-Ge; cm⁻¹): 3323 ν(NH; -CO-NH-); 2357; 1667 ν(C=O, -CONH-); 1598; 1536; 1444; 1310; 1137; 1115; 1024; 897; 754; 694
- ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): d 9.48 (1H, bs, NH), 9.27 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.57 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 7.76-7.70 (2H, m, H2', H6'), 7.44-7.36 (3H, m, H3', H5'), 7.22-7.15 (1H, m, H4')
- ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): d 159.7, 152.3, 144.2, 142.6, 142.3, 137.0, 129.2, 125.0, 119.8
- elementární analýza: vypočteno: C, 56.55 %; H, 3.45 %; N, 17.98 %; nalezeno: C, 56.38 %; H, 3.57 %; N, 18.05 %.

11. Výsledky biologických hodnocení

11. 1. Antimykobakteriální aktivita

Standardy: pyrazinamid – PZA, isoniazid – INH

Tabulka 1: Výsledky testů – antimykobakteriální aktivita

Testovaná látka (kód) MIC (µg/ml)	KMEN (kód)			
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. kansasii</i> 235/80	<i>M. avium</i> 80/72	<i>M. avium</i> 152
SL XI	25	25	>100	>100
SL XIV	6,25	12,5	>100	>100
SL XIII	3,13	>100	>100	>100
JZ 63	>100	>100	>100	>100
SL XIX	3,13	12,5	>100	>100
JZ 83	1,56	12,5	>100	>100
JZ 89	3,13	---	>100	>100
SL XVI	6,25	50	>100	>100
SL XVII	3,13	100	>100	50
JZ 94	3,13	---	>100	>100
SL XVIII	1,56	---	>100	>100
JZ 90	3,13	25	>100	50
PZA	6,25	>100	>100	>100
INH	1,56	25 - 50	6,25 - 12,5	3,13 – 6,25

Tabulka 2: Výsledky testů – antimykobakteriální aktivita: RETEST (25 – 0,39 µg/ml)

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód), MIC (µg/ml)						
	SL XVII	SL XVIII	SL XIX	JZ 83	JZ 89	JZ 90	INH
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12,5	>25	6,25	3,13	0,78	1,56	0,39
<i>M. kansasii</i> 235/80	>25	3,13	0,39	0,39	6,25	0,39	25
<i>M. avium</i> 80/72	>25	>25	>25	>25	>25	>25	6,25
<i>M. avium</i> 152	>25	>25	>25	>25	>25	>25	6,25

11. 2. Antifungální aktivita

Standardy: flukonazol – FLU, amfotericin B – AMB

Testované fungiální kmeny (kód, číslo):

- CA1** - *Candida albicans* ATCC 44859
- CT** - *Candida tropicalis* 156
- CK2**- *Candida krusei* E28
- CG** - *Candida glabrata* 20/l
- TA**- *Trichosporon asahii* 1188
- AF**- *Aspergillus fumigatus* 231
- AC**- *Absidia corymbifera* 272
- TM**- *Trychophyton mentagrophytes* 445

Tabulka 3: Výsledky testů – antifungální aktivita

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód), MIC (IC80/IC50) (μmol/l)							
	SL XI	SL XIV	SL XIII	JZ 63	SL XIX	JZ 83	FLU	AMB
CA1 24h 48h	>500	>125	>125	---*)	>500	>500	0,25	0,016
	>500	>125	>125	---	>500	>500	0,5	0,063
CT 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	0,5	0,063
	>500	>125	>125	---	>500	>500	>128	0,063
CK2 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	16	0,125
	>500	>125	>125	---	>500	>500	32	0,125
CG 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	4	0,031
	>500	>125	>125	---	>500	>500	16	0,125
TA 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	0,25	1
	>500	>125	>125	---	>500	>500	0,5	2
AF 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	>128	0,25
	>500	>125	>125	---	>500	>500	>128	0,125
AC 24h 48h	>500	>125	>125	---	>500	>500	>128	1
	>500	>125	>125	---	>500	>500	>128	2
TM 48h 72h	>500	>125	>125	---	>500	>500	8	1
	>500	>125	>125	---	>500	>500	16	1

*)látku JZ 63 se nepodařilo otestovat, vysrážena v médiu MHB (Mueller Hintonův bujon) i RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) - výsledky neprůkazné

Tabulka 4: Výsledky testů – antifungální aktivita (pokračování)

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód), MIC (IC80/IC50) (μmol/l)							
	JZ 89	SL XVI	SL XVII	JZ 94	SL XVIII	JZ 90	FLU	AMB
CA1 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	0,25	0,016
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	0,5	0,063
CT 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	0,5	0,063
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	>128	0,063
CK2 24h 48h	>500	>500	500	>125	>125	>500	16	0,125
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	32	0,125
CG 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	4	0,031
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	16	0,125
TA 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	0,25	1
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	0,5	2
AF 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	>128	0,25
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	>128	0,125
AC 24h 48h	>500	>500	>500	>125	>125	>500	>128	1
	>500	>500	>500	>125	>125	>500	>128	2
TM 48h 72h	>500	250	250	>125	>125	>500	8	1
	>500	250	250	>125	>125	>500	16	1

11. 3. Antibakteriální aktivita

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

Testované bakteriální kmeny (kód, číslo):

- SA - *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08
- MRSA- *Staphylococcus aureus* H5996/08
- SE- *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08
- EF- *Enterococcus sp.* J 14365/08
- EC- *Escheridia coli* CCM 4517
- KP- *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08
- KP-E- *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08
- PA- *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

Tabulka 5: Výsledky testů – antibakteriální aktivita

Kmen (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód), MIC (IC ₉₅) (μmol/l)						G-PEN	CIP	PHE
	SL XI	SLXIV	SLXIII	JZ 63	SL XIX	JZ 83			
SA 24h 48h	>500	>500	>250	---*)	>500	>500	0,24	0,98	0,24
	>500	>500	>250	---	>500	>500	0,24	0,98	0,24
MRSA24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	125	500	250
	>500	>500	>250	---	>500	>500	125	500	500
SE 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	31,25	250	62,5
	>500	>500	>250	---	>500	>500	125	250	250
EF 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	7,81	0,98	7,81
	>500	>500	>250	---	>500	>500	15,62	0,98	7,81
EC 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	125	0,06	>500
	>500	>500	>250	---	>500	>500	125	0,06	>500
KP 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	250	0,12	>500
	>500	>500	>250	---	>500	>500	500	0,12	>500
KP-E 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>250	---	>500	>500	>500	>500	>500
PA 24h 48h	>500	>500	>250	---	>500	>500	>500	3,9	>500
	>500	>500	>250	---	>500	>500	>500	7,81	>500

Tabulka 6: Výsledky testů – antibakteriální aktivita (pokračování)

Kmen (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód), MIC (IC ₉₅) (μmol/l)						PEN-G	CIP	PHE
	JZ 89	SL XVI	SL XVII	JZ 94	SL XVIII	JZ 90			
SA 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	0,24	0,98	0,24
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	0,24	0,98	0,24
MRSA24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	125	500	250
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	125	500	500
SE 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	31,25	250	62,5
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	125	250	250
EF 24h 48h	>500	>500	>500	125	>125	>500	7,81	0,98	7,81
	>500	>500	>500	500	>125	>500	15,62	0,98	7,81
EC 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	125	0,06	>500
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	125	0,06	>500
KP 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	250	0,12	>500
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	500	0,12	>500
KP-E24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	>500	>500
PA 24h 48h	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	3,9	>500
	>500	>500	>500	>500	>125	>500	>500	7,81	>500

*)látku JZ 63 se nepodařilo otestovat, vysrážení v MBH i RPMI -výsledky neprůkazné

VI. Diskuse a komentář

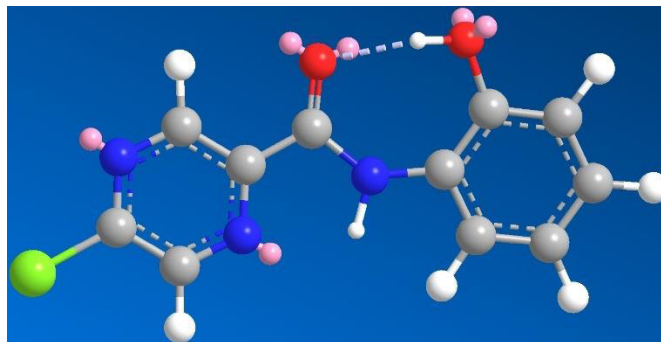
12.1. Syntéza

Pomocí klasických metod organické syntézy byly připraveny finální látky této práce, konkrétně metodou nukleofilní substituce chloridu kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové (vzniklého halogenací kyseliny 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové) vybranými deriváty anilinu, dle postupu Servusová a kol. [90] Reakce probíhala za mírných podmínek, v acetonu za standardní laboratorní teploty, s reakční dobou přibližně 2 - 3 hodiny a s průběžnou kontrolou pomocí TLC. Vybraný derivát anilinu byl do směsi přidáván v poměru 0,8 molárního ekvivalentu, v této hodnotě z důvodu neúplné přeměny kyseliny 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové kyseliny na chlorid 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny. Izolované výtěžky finálních produktů se po přečištění prostřednictvím preparativního chromatografu CombiFlash[®] Rf (silikagel, 10-30 % (V/V) ethyl-acetátu v hexanu) pohybovaly v rozmezí 18 – 78 %, nejčastěji okolo 50 %. Získané finální produkty jsou nové, v literatuře dosud nepopsané látky.

12.2. Lipofilita finálních struktur

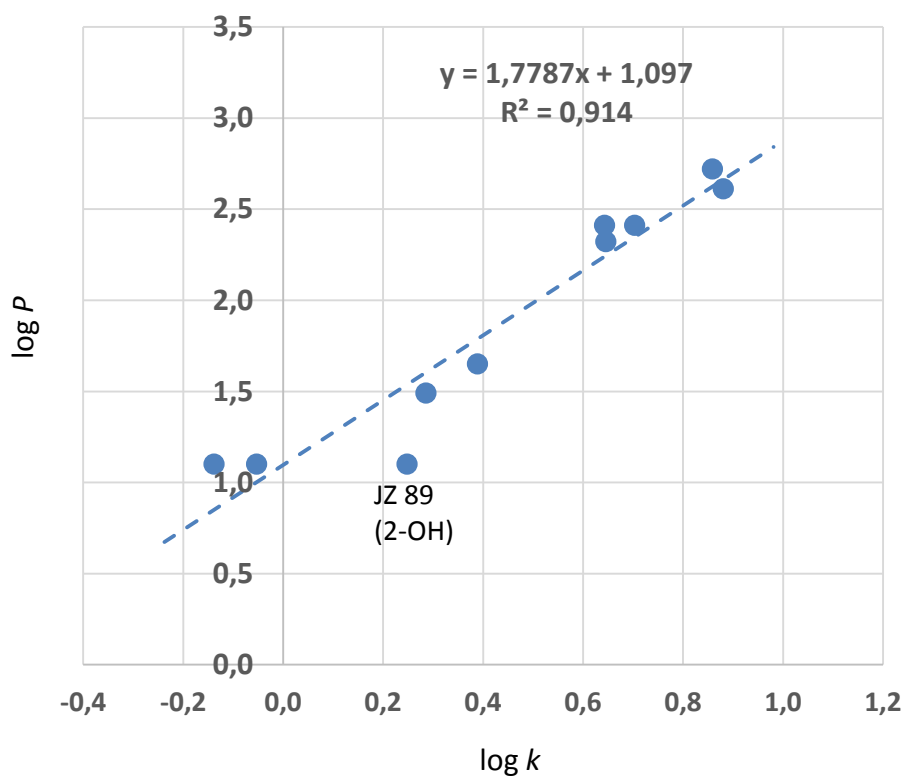
Lipofilita připravených látek byla vypočítána jako $\log P$ a $\text{Clog } P$ za použití komerčně dostupného programu CS ChemDraw Ultra ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Nadále byla lipofilita stanovena experimentálně jako $\log k$ pomocí RP-HPLC. Kapacitní faktor k byl vypočten dle vzorce $k = (t_R - t_D)$, kde t_R je retenční čas dané látky a t_D mrtvý čas kolony měřený jako retenční čas methanolického roztoku jodidu draselného (KI). $\log k$ je pak dekadickým logaritmem kapacitního faktoru k . Odhadovaná – vypočítaná hodnota $\log P$ pak vykazovala lineární korelaci s experimentálně naměřenou lipofilitou $\log k$ ($R^2 = 0,914$, $n = 10$), viz graf 1. Látka JZ 89 s 2-OH substitucí na fenylovém jádru se nachází výrazně pod přímkou lineární regrese. To znamená, že její změřená lipofilita $\log k$ je vyšší, než odpovídá výpočtu. Hydrofilní charakter -OH skupiny je maskován tvorbou intramolekulárního vodíkového můstku (Obr.2) Struktura JZ 89 byla namodelována a energeticky minimalizována pomocí programu Chem3D (CambridgeSoft) za použití metody MM2 s výchozími parametry.

Obrázek 2. Energeticky minimalizovaná struktura JZ 89. Tvorba intramolekulárního vodíkového můstku.



Dle očekávání i teoretického výpočtu byly lipofility nejnižší u látek substituovaných hydroxylovou skupinou (-OH), nejvyšší pak u látek s vícenásobnou substitucí halogenovými prvky (2,4,5-Cl₃; 3,4-Cl₂). Naměřené hodnoty lipofility neprokázaly dominantní vliv na antimykobakteriální aktivitu testovaných látek. (viz níže).

Graf 1. Závislost vypočtené lipofility ($\log P$) na experimentálně změřené lipofilitě ($\log k$).



12. 3. Hodnocení biologické aktivity

U žádné z dvanácti testovaných látek nebyla zaznamenána antifungální a antibakteriální aktivita vůči testovaným kmenům. Nejvyšší dosažené koncentrace u látek SL XIII, SL XIV, SL XVIII, JZ 63 a JZ 94 byly nižší než standardních 500 $\mu\text{mol/l}$ v důsledku omezené rozpustnosti v testovacím médiu. Dále látku JZ 63 nebylo na tyto aktivity možné testovat, jelikož docházelo k jejímu vysrážení v obou používaných médiích (MBH, RPMI).

Antimykobakteriální aktivita proti kmenu *M. tuberculosis* byla zaznamenána téměř u všech testovaných látek, pouze látka JZ 63 nevykazovala žádný účinek, pravděpodobně v důsledku vysoké lipofility vedoucí ke snížení rozpustnosti a vysrážení v testovacím médiu během inkubace. Významná antimykobakteriální aktivita byla zjištěna u látek SL XIII, SL XIV, SL XVI, SL XVII, SL XVIII, SL XIX, JZ 83, JZ 89, JZ 90, JZ 94 a to v rozmezí 1,56 až 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Šest z výše uvedených struktur (s $\text{MIC} \leq 3,13 \mu\text{g/ml}$) bylo nadále vybráno pro retest jejich aktivity v nižších koncentracích v rozsahu 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 – 0,78 – 0,39 $\mu\text{g/ml}$. Testování v nižších koncentracích potvrdilo aktivitu všech retestovaných sloučenin s výjimkou SL XVIII. Sloučenina SL XVII v opakovaném testu vykazovala sice o dva kroky dvojkového ředění vyšší MIC oproti prvnímu testu (původně $\text{MIC} = 3,13 \mu\text{g/ml}$, opakovaný test 12,5 $\mu\text{g/ml}$), nicméně běžná chyba této metody je 1-2 stupně dvojkového ředění. Nejvýraznější aktivita byla stanovena u JZ 89 ($\text{MIC}=0,78 \mu\text{g/ml}$) a JZ 90 ($\text{MIC}=1,56 \mu\text{g/ml}$). Z hlediska struktury jednotlivých derivátů anilidů kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové je pak možné jako nejvýznamněji aktivní uvést anilidy substituované -OH skupinou v -ortho a -para poloze, alkylhalogenové deriváty v -meta a -para poloze (konkrétně -CF₃), alkylový derivát a rovněž nesubstituovaný anilin. Z uvedených výsledků tak vyplývá, že antimykobakteriální aktivita v této sérii látek není závislá na substituci fenylového jádra anilinové části molekuly. Jsou zde tolerovány substituenty hydrofilní, lipofilní, elektronakceptorové i elektrondonorové. Srovnatelné hodnoty antimykobakteriální aktivity dalších substituovaných anilidů kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové jsou k porovnání uvedeny i ve výše zmíněném článku Servusová a kol. [90], kde byla výraznější aktivita zaznamenána vůči *M. tuberculosis* a *M. kansasii*, v obdobném rozmezí hodnot MIC, jaké jsou u látek publikovaných v této práci. Lipofilita jednotlivých látek rovněž nehrála významnou roli v jejich antimykobakteriálním působení, pouze u anilidů s více halogenovými

substituenty, kde byla naměřena výraznější lipofilita, byla sledována nižší antimykobakteriální aktivita, způsobená i nižší rozpustností v testovacím médiu.

Další významnější antimykobakteriální aktivita byla zaznamenána vůči kmenu *M. kansasii*, který je přirozeně rezistentní vůči PZA. U látek použitých pro retest antimykobakteriálních aktivit: SL XIX, JZ 83 a JZ 90 byla naměřena MIC= 0,39 µg/ml, která je pro tento kmen neočekávaně výrazná. Vzhledem k účinnosti těchto látek na kmen *M. kansasii* rezistentní vůči PZA vystupuje vpřed předpoklad o specifickém účinku těchto látek, u kterých je odhadovaným mechanismem účinku inhibice FAS I, která byla uváděna již při studii 5-CI-PZA. U kmenů *M. avium* nebyla pozorována žádná významnější antimykobakteriální aktivita.

12. 4. Cytotoxicita testovaných látek

Vzhledem k tomu, že hepatotoxicita je častým NÚ řady antituberkulotik používaných jak běžně v praxi (INH, PZA, RIF), tak u novějších léčiv v klinických studiích, je *in vitro* monitoring hepatotoxicity nových potenciálních anti-TBC běžný i u nově syntetizovaných látek, aby byl hlouběji zvážen jejich potenciaální prospěch v léčbě TBC v kombinaci s již používanými léčivy.

K vyhodnocení potenciaální hepatotoxicity byly *in vitro* stanoveny hodnoty IC₅₀ u vybraných sloučenin na buněčné linii lidských jaterních buněk HepG2. Pozorované snížení viability buněk HepG2 bylo měřeno za použití standardního protokolu [91] založeného na kalorimetrické metodě měření redukce soli tetrazolu. Tento model byl využit již pro studium hepatotoxicity mnoha předešlých potenciaálních anti-TBC [92, 93]. U většiny testovaných sloučenin byla zaznamenána významná toxicita, kdy se měřená IC₅₀ pohybovala v jednotkách až desítkách µmol/l. Vyšší hodnoty IC₅₀ (tj. nižší toxicita) byly zaznamenány u látek JZ 89, SL XVI a SL XVII, u nichž každá z uvedených tří látek obsahuje na připojeném fenylovém kruhu vázanou hydroxylovou skupinu (-OH) v různé poloze (2, 3 nebo 4). Tento fakt naznačuje, že vázaná -OH skupina má pravděpodobně podstatný vliv na konjugaci tohoto typu molekuly probíhající při její metabolizaci (detoxikační proces). Nadále byly získané hodnoty IC₅₀ použity k výpočtu indexu selektivity (SI), vztahujícího se k antimykobakteriální aktivitě proti *M. tuberculosis* H37Rv (SI = IC₅₀/MIC, po přepočtu MIC na jednotky molární koncentrace µmol/l). Žádná z testovaných sloučenin

nevykazovala hodnotu $SI > 10$, která je považována za bezpečnou hranici pro další vývoj zkoumané látky. Významnější hodnota byla získána pouze u látky SL XVII ($SI = 5,47 \rightarrow SI > 5$), která obsahovala -OH skupinu jako substituent na fenylovém kruhu.

VII. Závěr

Hlavním účelem této rigorózní práce bylo další rozšíření série derivátů pyrazinamidu/pyrazinkarboxylové kyseliny (PZA/POA), které na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové probíhá již řadu let. Základní strukturou, z níž tato práce vycházela, byl anilid kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové, přičemž samotný 5-chlorpyrazin-2-karboxamid byl již v devadesátých letech uveden jako významně aktivní (viz kapitola 3.1.).

Obsahem úvodní teoretické části jsou základní informace týkající se TBC, zejména etiologie, patogeneze, epidemiologie a současné farmakoterapie TBC a přehledu její problematiky v celosvětovém měřítku. Rozšířeněji jsou zde uvedena pouze data shrnující PZA/POA jako jedno ze základních léčiv TBC první linie, kde je podrobnější přehled vztážen na mechanismus účinku PZA/POA, zahrnující jak dlouhodobě uváděný nespecifický MÚ, tak nověji odhadované možnosti jeho specifického účinku. Další širší přehled k PZA/POA uvádí možnosti a postup přípravy jednoduchých obměn této základní struktury.

V rámci praktické části této práce bylo připraveno dvanáct nových (v literatuře dosud nepopsaných) látek typu anilidů 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny s různou substitucí na fenylovém jádře. Struktura všech připravených látek byla charakterizována IR, elementární analýzou, a ^1H a ^{13}C NMR spektry, přičemž analytická data připravených látek odpovídala očekávané struktuře. U všech připravených látek byla testována antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální aktivita ve srovnání se standardy (běžně užívanými léčivy) a nadále i jejich lipofilita a hepatotoxicita. Antimykobakteriální aktivita nově připravených látek byla testována na čtyřech vybraných kmenech: *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a dvou rozdílných kmenech *M. avium*, přičemž aktivita vůči *M. tuberculosis* byla u téměř všech nových struktur nejvýraznější. Většina připravených sloučenin vykazovala aktivitu vůči *M. tuberculosis* v rozmezí MIC = 0,78-6,25 $\mu\text{g/ml}$. Nejvýraznější, téměř 20x vyšší aktivita vůči *M. tuberculosis*, v porovnání s PZA (po přepočtu na molární koncentraci, $\mu\text{mol/l}$), byla zaznamenána u látky JZ 89 s -OH substitucí v *-ortho* poloze na fenylovém jádru. U kmene *M. kansasii*, rezistentního vůči PZA, byla rovněž zaznamenána významná antimykobakteriální aktivita u čtyř nově syntetizovaných látek (SL XIX, SL XVIII, JZ 83 a JZ 90) v rozsahu MIC = 0,39 až 3,13 $\mu\text{g/ml}$. U všech z uvedených látek byla

naměřena vyšší lipofilita (substituce 3-CF₃, 4-CF₃, 4-isopropyl a nesubstituovaný fenyl). Vzhledem k účinnosti na rezistentní kmen vůči PZA je možné odhadovat specifický mechanismus účinku těchto uvedených struktur. U obou kmenů *M. avium* a u testování antifungálního a antibakteriálního účinku nebyla pozorována žádná výraznější aktivita.

VIII. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Řešitel: Mgr. Lenka Slavětinská

Školitel: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Název rigorózní práce: Deriváty pyrazinu jako potencionální antituberkulotika

Cílem této práce byla příprava derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny, konkrétně substituovaných anilidů 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny s potencionálním antimykobakteriálním účinkem. V teoretické části práce je uveden stručný souhrn základních údajů týkajících se tuberkulózy (TBC) jako infekčního onemocnění. Zejména problematika zabývající se etiologií a patogenezí TBC, epidemiologií, jak běžné tak rezistentní formy TBC a rozsáhlou problematikou týkající se koinfekce TBC a HIV. Dále je zde popsána základní terapie TBC – antituberkulotika první a druhé linie a nadále i léčiva nacházející se v různých fázích klinických studií. Zvláštní pozornost je věnována pyrazinamidu (PZA), jehož analoga jsou hlavním tématem této práce. V této části jsou uvedeny zejména jednoduché možnosti chemických obměn pyrazinového jádra (prováděných již od 50. let minulého století a pokračujících dodnes) a informace ohledně možných specifických mechanismech účinku pyrazinamidu.

V praktické části této práce je prezentována příprava 12 nových, v literatuře dosud neuvedených látek, konkrétně anilidů 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny. Připravené látky jsou zde charakterizovány teplotou tání, IR, ^1H a ^{13}C NMR spektry a elementární analýzou. Všechny připravené látky byly podrobeny *in vitro* testování na antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* a dvěma různými kmenům *M. avium*. Většina připravených sloučenin vykazovala aktivitu vůči *M. tuberculosis* v rozmezí MIC = 0,78-6,25 $\mu\text{g/ml}$. Nejvýraznější, téměř 20x vyšší aktivita vůči *M. tuberculosis*, v porovnání s pyrazinamidem, po přepočtu na molární koncentraci ($\mu\text{mol/l}$), byla zaznamenána u 5-chlor-*N*-4-hydroxyfenyl-pyrazin-2-karboxamidu. Doplnkově byly látky podrobeny testování na antifungální a antibakteriální aktivitu, u kterých nebyly zaznamenány žádné výraznější výsledky vůči testovaným kmenům.

IX. Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Lenka Slavětinská

Supervisor: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Title of candidate thesis: Derivatives of pyrazine as potential antituberculous drugs

The aim of this thesis was a preparation of derivatives of pyrazine-2-carboxylic acid (POA), namely substituted anilides of 5-chloropyrazine-2-carboxylic acid with potential antituberculous activity. In the theoretical part of this thesis, there is a short description of tuberculosis (TB) as an infectious disease. The main topic of this part are: etiology and pathogenesis of TB, epidemiology of TB – both common and resistant TB form and a big problems with the co-infection between TB and HIV. Next part of the theory includes a therapy of TB, first and second line antituberculous as well some drugs in clinical trials. More detailed data are giving only to pyrazinamide (PZA), because its analogues are the basic topic of this thesis. There is a summary of simple structural modifications of pyrazine (in testing from 50's years of 20th century to present) and recent theories about pyrazinamide's mechanism of action.

In the practical part of this thesis is presented preparation of 12 new, in the literature so far not mentioned substances, namely anilides 5-chloropyrazine-2-carboxylic acid. Prepared substances are characterized by melting point, IR, ^1H and ^{13}C NMR spectra and elementary analysis. All prepared compounds were subjected to *in vitro* testing for their potential antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* and two different strains of *M. avium*. Most of the prepared compounds showed activity against *M. tuberculosis* in the range of MIC = 0,78-6,25 $\mu\text{g/ml}$. The best substance (5-chloro-N-4-hydroxyphenyl-pyrazine—carboxamide), showed almost 20x higher activity against *M. tuberculosis* compared to PZA, after conversion to molar concentration ($\mu\text{mol/l}$). Additionally, the substances were subjected to testing for the antifungal and antibacterial activity, in which there were no significant results against the tested strains.

X. Seznam použité literatury

- [1] JEDLIČKA, J.: *Klinika plicní tuberkulózy*. Česko-slovenská grafická unie, a. s., Praha, **1939**; s. 5-17.
- [2] HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H., D.; MINNIKIN, D., E. et al. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Easter Mediterranean. *PLoS ONE*. **2008**; vol. 3, s. e3426.
- [3] ČEŠKA, R. a kolektiv. *Interna*, 1. vydání, Triton **2010**, s. 481-487, ISBN: 978-80-7387-423-0.
- [4] ALSTEENS, D.; VERBELEN, C.; DAGUE, E. et al. Organization of the mycobacterial cell wall: a nanoscale view. *Pflügers Archiv*. **2008**; vol. 456, s. 117-125.
- [5] TEŘL, M., KRÁKOROVÁ, G., PEŠEK, M. a kol. *Plicní lékařství*, Praha, Karolinum **2004**; s. 123-133, ISBN: 80-246-0820-0.
- [6] GREENWOOD, D. et al. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogenze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. české. Praha: Grada Publishing, **1999**; *Mykobakterie*, s. 215-219. ISBN 80-7169-365-0.
- [7] KŘEPELA, K., KOS, S. Tuberkulóza dětí a mladistvých. *Standard léčebného plánu PED 6*. [online] **2012**. [cit. 2013-06-05] Dostupné z: <https://www.google.cz/#psj=1&q=K%C5%99epela%2C+K.%2C+Kos%2C+S.%3B+Tuberkul%C3%B3za+d%C4%9Bt%C3%AD+a+mladstv%C3%BDch.+Standard+l%C3%A9%8Debn%C3%A9ho+pl%C3%A1nu+PED+6>
- [8] PUNGA, V. V., JAKUBOWIAK, W. M., DANILOVA, I. D., et al. Prevalence of extensively drug-resistant tuberculosis in Vladimir and Orel regions, Russia. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, **2009**; vol. 13, s. 1309-1312.
- [9] World Health Organization; *Global tuberculosis report 2012*.; Geneva, Switzerland: WHO; s. 1-90. WHO document no. WHO/HTM/TB/2012.6 Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
- [10] HOMOLKA, J.: Tuberkulóza – dosud nevyřešený problém. *Stud. Pneumol. Phthiseol.* 5, **2006**; s. 183.

- [11] BÁRTŮ, V. Tuberkulóza - současný stav. *Postgraduální medicína* [online]. **2011**. [cit. 2013-06-20]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/tuberkuloza-soucasny-stav-460138>
- [12] WALLENFELS, J. Epidemiologická situace TBC v České Republice. *Národní jednotka dohledu nad TBC, FN na Bulovce. 1. LF UK, Praha, Albertov*, [online] **2009**. [cit. 2013-06-20]. Dostupné z: <http://www.lf1.cuni.cz/Data/files/UIM/materials/doc/Integrovaný%20blok/epidemiologie-tbc-wallenfels-.pdf>
- [13] ORENSTEIN, E. W., BASU, S., SHAH, N. C. et al. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **2009**; vol. 9, s. 53-61.
- [14] JACOBSON, K. R., TIERNEY D. B., JEON, C. Y., MITNICK, C. D., MURRAY, M. B. Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*, **2010**; vol. 51; s. 6-14.
- [15] LEIMANE V., LEIMANS J. Tuberculosis control in Latvia: integrated DOTS and DOTS-Plus programmes. *Eurosurveillance*, **2006**; vol. 11, s. 1-3.
- [16] World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva, Switzerland: WHO, **2010**. WHO document no. WHO/HTM/TB/2010.3 Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf
- [17] COX, H., FORD, N. Linezolid for the treatment of complicated drug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2012**; vol. 16, s. 447-454.
- [18] DIAS-BABTISTA, I., M., F.; USÓ, S., M., R., S.; MARCONDES-MACHADO, J. Trends in multidrug-resistant tuberculosis. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. **2008**; vol. 14, s. 203-223;
- [19] MATHEMA, B., KUREPINA, N., E., BIFANI P., J., KREISWIRTH, B., N. Molecular epidemiology of tuberculosis: current in sights. *Clin. Microbiol. Rev*. **2006**; vol. 19, s. 658-685.
- [20] MITCHINSON, D.; DAVIES, G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int J Tuberc Lung Dis*. **2012**; vol. 16, s. 724-732.

- [21] World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009. Geneva, Switzerland: WHO; **2009**. WHO document no. WHO/HTM/TB/2009.411
Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802_eng_doc.pdf
- [22] World health organization. Anti-tuberculous drug resistance in the world. Report No. 4. Geneva, Switzerland: WHO; **2008**. WHO document no. WHO/HTM/TB/2008.394.
Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: http://www.who.int/tb/publications/2008/drs_report4_26feb08.pdf
- [23] SUCHINDRAN, S.; BROUWER, E., S.; VAN RIE, A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review. *PloS One* **2009**; vol. 4, e5561
- [24] ANANDAIAH, A. Novel Developments in the Epidemic of Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis Coinfection. *Am J Respir Crit Care Med*, **2011**; vol. 183, s. 987-997.
- [25] DANIEL, T., M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*. **2006**; vol. 100, No. 11, s. 1862-1870.
- [26] MICROMEDEX. Healthcare Series. vol. 110; *Drugdex Product Index*. MICROMEDEX Inc. **1974-2001**.
- [27] JOHNSON, K.; KING, D., S.; SCHULTZ, P., G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society*. **1995**; vol. 117, s. 5009-5010.
- [28] LEI, B., F.; WEI, C., J.; TU, S., C. Action mechanism of antitubercular isoniazid Activation mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor. *Journal of biological chemistry*. **2000**; vol. 275, s. 2520-2526.
- [29] SHI, R.; ITAGAKI, N.; SUGAWARA , I. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini reviews in medicinal chemistry*. **2007**; vol. 7, s. 1177-1185.
- [30] MANDELL, G., L.; BENNETT, J., E.; DOLIN, R., R. Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 9th ed. CD-ROM for Windows. Edinburgh: Churchill Livingstone, **2000**.

- [31] HO, M., X.; HUDSON, B., P.; DAS, K. et al. Structures of RNA polymerase-antibiotic complexes. *Current Opinion in structural Biology*. **2009**; vol. 19, s. 715-723.
- [32] TAKAYAMA, K.; KILBURN, J., O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1989**; vol. 33, s. 1493-1499.
- [33] WOLUCKA, B., A.; McNEIL, M., R.; DEHOFFMANN, E. et al. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *Journal of biological chemistry*. **1994**; vol. 269, s. 23328-23335.
- [34] TELENTI, A.; PHILIPP, W., J.; BERNASCONI, C.; WIELES, B. et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine*. **1997**; vol. 3, s. 567-570.
- [35] ARAHAM, D., J.; ROTELLA, D., P. Tuberculosis: A global public health threat. *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development. Antiinfectives*. **2007**; vol. 7, s. 755-759.
- [36] MALONE, I. The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *The American review of tuberculosis*. 1952, **1952**; vol. 65, s. 511-518.
- [37] SCORPIO, A.; ZHANG, Y. Mutation in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nikotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med*. **1996**; vol. 2, s. 662-667.
- [38] ZHANG, Y. et al. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Bacteriol*. **1999**; vol. 181, s. 2044-2049.
- [39] ZHANG, Y; WADE, M.; SCORPIO, A. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. **2003**; vol. 52, s. 790-795.
- [40] SCORPIO, A. et Al. Characterization of *pncA* mutations in pyrezinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1997**; vol. 41, s. 540-543.

- [41] NGO, S., C.; ZIMHONY, O.; CHUNG, W., J. et al. Inhibition of isolated mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2007**; vol. 51, s. 2430-2435,
- [42] SAYAHI, H.; ZIMHONY, O.; JACOBS, W., R., Jr. et al. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2011**; vol. 21, s. 4804-4807.
- [43] McKENZIE, D.; MALONE, L. et al. The effect of nicotinamide on experimental tuberculosis of white mice. **1948**; vol. 33, s. 1249-1253.
- [44] SCHPANCHENKO, O., V.; BUGAEVA, E., Yu.; GOLOVIN, A., V. et al. Trans-translation: Findings and hypotheses. *Molecular Biology*. **2010**; vol. 44, s. 495-502.
- [45] SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X. et al. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science*. **2011**; vol. 333, s. 1630-1632.
- [46] Medical Research Council. Streptomycin treatment of pulmonary tuberculosis. *BMJ*. **1948**; s. 769-782.
- [47] BEGG, E., J.; BARCLAY, M., L. Aminoglycosides – 50 years on. *British journal of clinical pharmacology*. **1995**; vol. 39, s. 597- 603.
- [48] HARTL, J., DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., OPLETALOVÁ, V., ZIMČÍK, P. *Farmaceutická chemie IV*, 1.vyd., Praha, Karolinum **2006**, 166 s. ISBN 80-246-1169-4.
- [49] BASTIAN, I.; COLEBUNDERS, R. Treatment and prevention of multidrug-resistant tuberculosis. *Drugs*. **1999**; vol. 58, s. 633-661.
- [50] RENGARAJAN, J.; SASSETTI, C., M.; BLOOM, B., R. et al. The folate pathway is a target for resistance to the drug *para*-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular Microbiology*. **2004**; vol. 53, s. 275-282.
- [51] WANG, F.; LANGLEY, R.; GULTEN, G.; SACCHETTINI, J., C. et al. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *JEM*. **2007**; vol. 204, s. 73-78.
- [52] YEW, W., W.; LEUNG, C., C. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology*. **2007**; vol. 13, s. 21-46.
- [53] CACERES, N., E.; HARRIS, N., B.; WELLEHAN, J., F. et al. Over expression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in

- Mycobacterium smegmatis. *Journal of bacteriology*. **1997**; vol. 179, s. 5046-5055.
- [54] VALERIO, G.; BRACCIALE, P.; MANISCO, V.; QUITADAMO, M.; LEGARI, G. et al. Long-term tolerance and effectiveness of moxifloxacin therapy for tuberculosis: preliminary results. *J. Chemother*. **2003**; vol. 15, s. 66-70.
- [55] SCHECTER, G., F.; SCOTT, C.; TRUE, L. et al. Linezolid in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*. **2010**; vol. 50, s. 49-55.
- [56] WILSON, A., P., R.; CEPEDA, J.; HAYMAN, S. et al. In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens to linezolid and teicoplanin and effect on outcome in critically ill patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2006**; vol. 58, s. 470-473.
- [57] XU, H-B.; JIANG, R-H.; LI, L. et al. Linezolid in the treatment of MDR-TB: a retrospective clinical study. *International journal of tuberculosis and lung disease*. **2012**; vol. 16, s. 358-363.
- [58] Phase 2a EBA Trial of AZD5847 – NCT01516203. *Smart Patients*. [online]. **2013** [cit. 2013-06-22]. Dostupné z: <https://www.smartpatients.com/trials/NCT01516203>
- [59] VILLEMAGNE, B.; CRAUSTE, C.; FLIPO, M. et al. Tuberculosis: The drug development pipeline at a glance. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**; vol. 51, s. 1-16.
- [60] ARBISER, J., L.; MOSCHELLA, S., L. Clofazimine - A review of its medical uses and mechanisms of action. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **1995**; vol. 32, s. 241-247.
- [61] CHOLO, M., C.; STEEL, H., C.; FOURIE, P., B. et al. Clofazimine: current status and future prospects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2012**; vol. 67, s. 290-298.
- [62] ABATE, G.; MIÖRNER, H. Susceptibility of multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis to amoxicillin in combination with clavulanic acid and ethambutol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1998**; vol. 42, s. 735-740.
- [63] HAAGSMA, A., C.; PODASCA, I.; KOUL, A. et al. Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase. *PLOS ONE*. **2011**; vol. 6, s. e23575.

- [64] LENAERTS, A., J.; HOFF, D.; ALY, S. et al. Location of persisting mycobacteria in a guinea pig model of tuberculosis revealed by R207910. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **2007**; vol. 51, s. 3338-3345.
- [65] CRASTO, A.; M. Bedaquiline (Sirturo, TMC207 or R207910) FDA approves 1st new tuberculosis drug in 40 years. *Eurekamoments in Organic Chemistry*. [online] **2013**. [cit. 2013-09-20]. Dostupné z: <http://amcrasto.theeurekamoments.com/2013/01/11/bedaquilinesirturo-tmc207-or-r207910-fda-approves-1st-new-tuberculosis-drug-in-40-years/#.UmqbqhC6jIU>
- [66] GINSBERG, A., M. Drugs in development for tuberculosis. *Global Alliance for TB Drug Development, New York, USA*. **2010**; vol. 70, s. 2201-2214.
- [67] BARRY, P., J.; O'CONNOR, T., M. Novel agents in the management of Mycobacterium tuberculosis disease. *Current Medicinal Chemistry*. **2007**; vol. 14, s. 2000-2008.
- [68] PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2005**; vol. 56, s. 968-974.
- [69] YADAV, P.; DEOLEKAR, P.; KANASE, V.; MISHRA, S. Overview of new anti TB drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **2012**; vol. 3, s. 2472-2481.
- [70] BOSHOFF, H., J.; MYERS, T., G.; COPP, B., R. et al. The transcriptional responses of Mycobacterium tuberculosis to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *Journal of Biological Chemistry*. **2004**; vol. 279, s. 40174-40184.
- [71] BROOKS, J., V.; FURNEY, S., K.; ORME, I., M. et al. Metronidazole therapy in mice infected with tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1999**; vol. 43, s. 1285-1288.
- [72] STOVER, C., K.; WARRENER, D., R.; VANDEVANTER, D., R. et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*. **2000**; vol. 405, s. 962-966.
- [73] MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T. et al. OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivate with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Medicine*. **2006**; vol. 3, s. 2131-2144.

- [74] MANJUNATHA, U., H.; BOSHOFF, H.; DOWD, C., S. et al. Identification of nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America*. **2006**; vol. 103, s. 431-436.
- [75] SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H., I. et al. PA-824 kills nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by intracellular NO release. *Science*. **2008**; vol. 322, s. 1392-1395.
- [76] ROGERS, E., F.; LEANZA, W., J.; BECKER, H., J. et al. Antitubercular Diazine Carboxamides. *Science*. **1952**; vol. 116, s. 253-254.
- [77] CYNAMON, M., H.; SPEIRS, R., J.; WELCH, J., T. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1998**; vol. 42, s. 462-463.
- [78] SAYAHI, H.; PUGLIESE, K., M.; ZIMHONY, O. et al. Analogs of the Antituberculous Agent Pyrazinamide are Competitive Inhibitors of NADPH binding to *M. tuberculosis* Fatty Acid Synthase I. *Chemistry & Biodiversity*. **2012**; vol. 9, No. 11, s. 2582-2596.
- [79] SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Organic chemistry*. 10. vyd., New York, J. Wiley & Sons. **2011**; s. 779-830.
- [80] SVOBODA, J. *Organická syntéza I.*, 1. vyd., Praha, Vysoká škola chemicko-technologická. **2000**; s. 268-280.
- [81] CYNAMON, M., H.; GIMI, R.; GYENES, F. et al. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. *Journal of medicinal chemistry*. **1995**; vol. 38, s. 3902-3907.
- [82] SPEIRS, R., J.; WELCH, J., T.; CYNAMON, M., H. Activity of n-propyl pyrazinoate against pyrazinamide resistant *mycobacterium-tuberculosis* - investigations into mechanism of action of and mechanism of resistance to pyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1995**; vol. 39, s. 1269-1271.
- [83] DOLEZAL, M.; HARTL, J.; MILETIN, M. Antimycobacterial evaluation of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acid. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*. **2000**; vol. 25, s. 15-19.
- [84] DOLEZAL, M.; PALEK, L.; VINSOVA, J. et al. Substituted pyrazinecarboxamides : synthesis and biological evaluation. *Molecules*. **2006**; vol. 11, s. 242-256.

- [85] DOLEZAL, M.; CMEDLOVA, P.; PALEK, L. et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European journal of medicinal chemistry*. **2008**; vol. 43, s. 1105-1113.
- [86] TEYSSIER, L. Higher activity of morphazinamide over pyrazinamide against intracellular. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. **2001**; vol. 5, s. 386.
- [87] CHUNG, W., J.; KORNILOV, A.; BRODSKY, B., H. et al. Inhibition of M. tuberculosis in vitro in monocytes and in mice by aminomethylene pyrazinamide analogs. *Tuberculosis*. **2008**; vol. 88, s. 410-419.
- [88] SIMOES, M., F.; VALENTE, E.; RODRIGUEZ-GOMEZ, M., J. et al. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs Stability, activation and activity against M. tuberculosis. *European journal of pharmaceutical sciences*. **2009**; vol. 37, s. 257-263.
- [89] MATULENKO, A., M.; JIANG, M.; FREY, R., R. et al. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine: structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **2005**; vol. 13, s. 3705-3720.
- [90] SERVUSOVÁ, B.; ZITKO, J.; DOLEŽAL, M. et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**; vol. 12, s. 3589-3591.
- [91] Promega Corporation. CellTiter 96[®] Aqueous one solution cell Proliferation assay. Owen, T.C. U.S. Patent; **1993**; vol. 5; s. 185, 450.
- [92] TOSTMANN, A.; BOEREE, M., J.; PETERS, W., H., M.; ROELOFS, H., M., J.; AARNOUTSE, R., E.; VAN DER VEN, A.; DEKHUIJZEN, P., N., R. Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce in vitro pyrazinamide toxicity. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **2008**; vol. 31, s. 577-580.
- [93] SINGH, M.; SASI, P.; RAI, G.; GUPTA, V., H.; AMARAPURKAR, D.; WANGIKAR P., P. Studies on toxicity of antitubercular drugs namely isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in an in vitro model of HepG2 cell line. *Med. Chem. Res*. **2011**; vol. 20, s. 1611-1615.