

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva V.

Diplomová práce

Vedoucí katedry:

Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Vedoucí diplomové práce:

prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Řešitel:

Alžběta Mindlová

Hradec Králové, 2016

Poděkování

Chtěla bych upřímně poděkovat vedoucímu mé diplomové práce prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a také PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za vstřícnost, ochotu, trpělivost, cenné rady a neocenitelnou pomoc po celou dobu vypracování této práce. Rovněž děkuji Mgr. Ondřeji Jand'ourkovi za pomoc při biologickém testování mých látek. Velký dík také patří mým rodičům, kteří mě po celou dobu studia plně podporovali.

Tato diplomová práce je výsledkem realizace projektu: „Podpora vzniku, rozvoje a mobility kvalitních výzkumných týmů na Univerzitě Karlově“, číslo projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0022, podporovaného Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost (OP VK) a spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Další podpora byla poskytnuta Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 291).



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

Alžběta Mindlová

V Hradci Králové 13. 5. 2016

OBSAH

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 7 |
| 2. | CÍL PRÁCE | 10 |
| 3. | TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 3.1 | Charakteristika tuberkulózy | 11 |
| 3.2 | Symptomy | 13 |
| 3.3 | Diagnostika | 14 |
| 3.4 | Etiopatogeneze | 16 |
| 3.5 | Terapie | 19 |
| 3.5.1 | Léčiva 1. linie | 20 |
| 3.5.2 | Léčiva 2. linie | 28 |
| 3.6 | Rezistence | 31 |
| 3.7 | Vakcinace | 33 |
| 4. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 34 |
| 4.1 | Použité postupy, chemikálie, přístroje | 34 |
| 4.2 | Výchozí látky | 36 |
| 4.3 | Příprava nových látek | 37 |
| 4.4 | Nově připravené látky | 39 |
| 4.4.1 | 4-chlor- <i>N</i> -(4-chlorbenzoyl)- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 39 |
| 4.4.2 | 4-methoxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 40 |
| 4.4.3 | 3-chlor- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 41 |
| 4.4.4 | 3-methoxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 42 |
| 4.4.5 | 4-acetoxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 43 |
| 4.4.6 | 2-hydroxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 44 |
| 4.4.7 | 3-(trifluormethyl)- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 45 |
| 4.4.8 | 2-methoxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 46 |
| 4.4.9 | 4-methyl- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 47 |
| 4.4.10 | 2-chlor- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 48 |
| 4.4.11 | 3-(acetoxy)- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 49 |
| 4.4.12 | 3-hydroxy- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 50 |
| 4.4.13 | 4-ethyl- <i>N</i> -(pyrazin-2-yl)benzamid | 51 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.4.14 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-methylbenzamid | 52 |
| 4.4.15 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-ethylbenzamid | 53 |
| 4.4.16 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)benzamid | 54 |
| 4.4.17 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-chlorbenzamid | 55 |
| 4.4.18 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-methoxybenzamid | 56 |
| 4.4.19 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-2-methoxybenzamid | 57 |
| 4.4.20 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid | 58 |
| 4.4.21 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-2-chlorbenzamid | 59 |
| 4.4.22 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-methoxybenzamid | 60 |
| 4.4.23 | <i>N</i> -(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-chlorbenzamid | 61 |
| 4.5 | Výsledky biologického testování | 62 |
| 4.5.1 | Antifungální aktivita | 62 |
| 4.5.2 | Antibakteriální aktivita | 64 |
| 4.5.3 | Antimykobakteriální aktivita | 67 |
| 5. | DISKUZE | 69 |
| 6. | ZÁVĚR | 72 |
| 7. | ABSTRAKT | 74 |
| 8. | ABSTRAKT | 75 |
| 9. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 76 |

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------|---|
| AC | amikacin |
| AIDS | (Acquired Immunodeficiency Syndrome) Syndrom získaného selhání imunity |
| Arg | arginin |
| Asp | aspartát |
| CS | cykloserin |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DNA | (Deoxyribonucleic Acid) deoxyribonukleová kyselina |
| EMB | ethambutol |
| ETA | ethionamid |
| FAS I | (Fatty Acid Synthase I) syntasa mastných kyselin I |
| G+, G- | (Gram-positive, Gram-negative) gram pozitivní, gram negativní |
| GIT | gastrointestinální trakt |
| HCl | kyselina chlorovodíková |
| His | histidin |
| HIV | (Human Immunodeficiency Virus) virus lidské imunitní nedostatečnosti |
| HPLC | (High-performance Liquid Chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IČ, IR | infračervené spektrum |
| IFN | interferon |

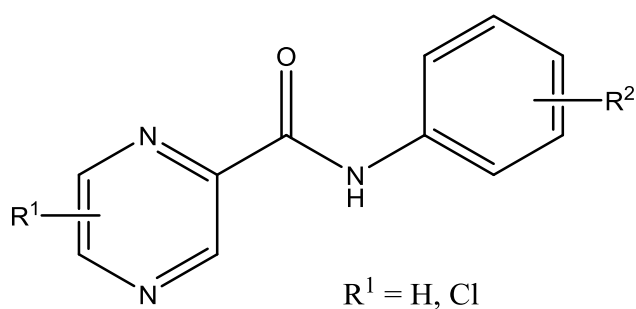
| | |
|--------------|--|
| IGRA | Interferon Gamma Release Assay |
| INH | isoniazid |
| KatG | enzym katalasa/peroxidasa |
| KM | kanamycin |
| KSRZIS | Koordinační středisko pro resortní zdravotnické informační systémy |
| LAM | lipoarabinomannan |
| log <i>P</i> | rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda |
| LTBI | (Latent Tuberculosis Infection) latentní forma tuberkulózy |
| Lys | lysin |
| <i>M.</i> | <i>Mycobacterium</i> |
| <i>MA</i> | <i>Mycobacterium avium</i> |
| MDR | (Multidrug-resistant) mnohočetná léková rezistence |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| <i>MK</i> | <i>Mycobacterium kansasii</i> |
| mRNA | (Messenger Ribonucleic Acid) mediátorová ribonukleová kyselina |
| <i>MS</i> | <i>Mycobacterium smegmatis</i> |
| <i>MT</i> | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| NADPH | nikotinamidadeninukleotidfosfát |
| NÚ | nežádoucí účinky |
| NYS | nystatin |

| | |
|-------|---|
| PAS | <i>para</i> -aminosalicylová kyselina |
| PCR | (Polymerase Chain Reaction) polymerázová řetězová reakce |
| Phe | fenylalanin |
| POA | pyrazin-2-karboxylová kyselina (pyrazinová kyselina) |
| POE | ester kyseliny pyrazinové |
| PZA | pyrazinamid |
| PZasa | pyrazinamidasa |
| REF | reference |
| RMP | rifampicin |
| RNA | (Ribonucleic Acid) ribonukleová kyselina |
| RpsA | (Ribosomal Protein SA) ribozomální protein S |
| RTBC | Registr tuberkulózy |
| STM | streptomycin |
| TBC | tuberkulóza |
| TLC | (Thin-layer chromatography) tenkovrstvá chromatografie |
| TM | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> |
| tRNA | (Transfer Ribonucleic Acid) transferová ribonukleová kyselina |
| WHO | (World Health Organization) Světová zdravotnická organizace |
| XDR | (Extensive Drug Resistance) extenzivní léková rezistence |

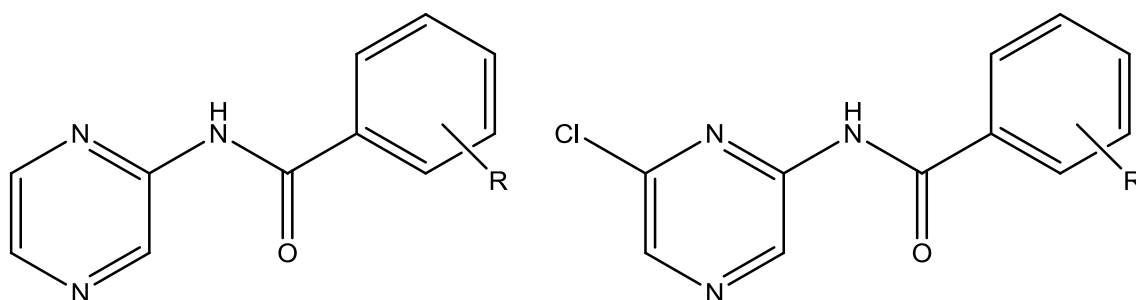
2. CÍL PRÁCE

Na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty se už léta zabývají vývojem nových potenciálních antituberkulotik. Cílem mé práce bylo navázat na jejich výzkum a připravit sérii derivátů pyrazinamidu, u kterých by se dala očekávat biologická účinnost proti mykobakteriím.

Vycházela jsem z již připravených anilidů kyseliny pyrazin-2-karboxylové, u kterých byla prokázána antimykobakteriální aktivita. [1][56][61][62][63]



Série nově připravených derivátů pyrazinu, kterými jsem se zabývala, byla založena na obměně spojení mezi pyrazinovým a benzenovým jádrem.



3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika tuberkulózy

Tuberkulóza je granulomatózní zánět, jehož původcem jsou bakterie tzv. komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, který zahrnuje různé druhy mykobakterií jako jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* a *Mycobacterium bovis* aj.. Tato tyčinkovitá bakterie byla objevena v roce 1882 Robertem Kochem. Stěna mykobakterií obsahuje mykolové kyseliny, což jsou dlouhořetězcové mastné kyseliny, které jsou buď kovalentně, nebo nekovalentně vázány k buněčné stěně tvořené arabinolaktanem, jež kryje peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny [2]. V této struktuře jsou dále zakotveny další struktury, například lipoarabinomanan (LAM). Ten je zastoupen ve stěnách mykobakterií třemi typy, které se odlišují rozdílnými imunomodulačními vlastnostmi k imunitnímu stavu hostitele. Například LAM zakončený manózou přímo inhibuje odpověď makrofágů na mykobakteriální infekci, tlumí buněčnou T-proliferaci a aktivaci v systémech in vivo. Další složky buněčné stěny jsou odpovědné za inhibici fúze fagozomů s lysozomy a jsou toxické pro mitochondrie, jiné zase inhibují signální cestu IFN-gama receptoru, čímž negativně ovlivňují zpracování antigenu. Mykolové kyseliny alfa-, keto- a methoxy- se tedy liší ve schopnosti přitahovat neutrofily, indukovat pěnové makrofágy nebo přijmout antigení strukturu pro rozpoznávání protilátkou. Tato komplikovaná struktura je příčinou nízké permeability, proto většina léčiv do mykobakterií neproniká. Navíc jsou mykobakterie většinou schovány v makrofázích [3][4].

Zdrojem nákazy je většinou člověk s aktivní formou tuberkulózy. Přenos do organismu se děje nejčastěji dýcháním, v menší míře požitím infikované potravy nebo sekretů a také poraněním pracovníků ve zdravotnickém zařízení. Zvýšené riziko nákazy je u podvyživených osob, alkoholiků, pacientů s diabetem mellitus a osob se sníženou

imunitou způsobenou např. onemocněním AIDS. Mezi rizikové skupiny patří také imigranti ze zemí s vysokým výskytem tuberkulózy [2][5].

Tuberkulóza má dva základní typy – primární a postprimární. Primární, nebo-li TBC dětského věku, se vyskytuje u pacientů, jež nikdy nepřišli do kontaktu s mykobakteriemi a tudíž u nich není vyvinuta přecitlivělost buněčného typu. Přenos se děje výlučně formou kapénkové infekce od pacienta s infekční TBC, vzácně přímým přenosem např. u personálu na pitevnách. Tuberkulózní bacil se vdechnutím dostane do plic, kde se usadí a pomnoží a vytvoří se sérofibrinózní exsudát, který obsahuje makrofágy, jež se označují též jako Orthovy buňky. V jejich cytoplazmě již lze mykobakterie prokázat. Exsudát se může v případě dobré imunity sám resorbovat nebo může proliferovat a vzniká granulární tkáň, která se může zjizvit. V případě progresu zánětu vzniká po několika dnech v tomto místě kazeifikační nekróza obklopená granulomatózní tkání. Toto ložisko společně s regionální lymfadenitis (zánětu místních uzlin) tvoří tzv. primární tuberkulózní komplex, který poprvé popsal pražský německý patolog A. Ghon a podle kterého se někdy nazývá Ghonův komplex. U většiny jedinců se zánět vyhojí kalcifikováním ložiska. Jen u 10 % především oslabených jedinců tuberkulóza progreduje a šíří se krevní a lymfatickou cestou do různých orgánů, často do ledvin, kostí, nadvarlat a mozkových plen. V případě drobných ložisek mluvíme o tzv. generalizované miliární tuberkulóze. V případě větších uzlů používáme označení generalizovaná velkouzlová tuberkulóza orgánů, která přímo ohrožuje pacienta na životě [2][5].

Latentní forma tuberkulózy (LTBI) se objeví tehdy, když je pacient nakažen mykobakteriemi, které jsou v těle potlačeny účinnou imunitní odpovědí. Mykobakterie zůstávají živé, ale jsou neaktivní. Infekce je asymptomatická a nepřenáší se. Pokud nejsou pacienti léčeni, může se u nich vyvinout aktivní tuberkulóza. Vyšší riziko je u pacientů s oslabenou imunitou. Nemoc se může projevit až za několik měsíců popřípadě let [6].

Postprimární, nebo-li sekundární TBC se vyskytuje v dospělém věku u pacientů, kteří se již s infekcí setkali. Většinou se jedná o lidi s oslabenou imunitou. Způsob nákazy může být tzv. reaktivací primárního ložiska nebo reinfekcí. Většinou se zánět vyskytuje v plicním hrotu (Aschoffův infiltrát), kde vzniká kazeifikační nekróza, která se

může opět zhojit jizvou. V jiném případě zánět progreduje, nahlodá bronchus a po vykašlání zkapalněného obsahu vzniká v místě nekrózy nepravidelná dutina – kaverna. V tomto případě mluvíme o kavernózní tuberkulóze. U této formy může zánět nahlodat stěnu tepny a pacient umírá na vykrvácení nebo zadušení vlastní krví. Sekundární TBC může napadat i jiné orgány v důsledku reaktivace metastázy nebo metastázy z reaktivovaného primárního komplexu. Polykáním infikovaného sputa se zánět může rozšířit na oblast tenkého a tlustého střeva (tzv. ileocekální oblast) [2][5].

3.2 Symptomy

Jelikož tuberkulóza postihuje z 80 % plíce, hlavními příznaky tohoto onemocnění je trvalý kašel, bolest na hrudi, zvýšená teplota, úbytek na váze a dušnost vedoucí až k úmrtí pacienta. Někdy může být prvotním příznakem až vykašlávání krve. Orgánové postižení (mimoplicní TBC) je provázeno systémovou symptomologií [7].

3.3 Diagnostika

Jednou z nejpoužívanější metodou diagnostiky je mikroskopické vyšetření získaného materiálu a následná kultivace mykobakterií. U plicní formy tuberkulózy se sputum nebo bronchiální sekret vyšetřuje pomocí barvení dle Ziehla – Neelsena.

Metoda dle Ziehla - Neelsena je založena na principu schopnosti acidorezistentních bakterií přijímat zahřátá barviva (např. karbofuschin), která i po odbarvení kyselým alkoholem zůstanou ve stěně bakterie. Plamenem fixovaný preparát se přelije karbofuschinem a opláchne vodou. Poté se odbarví kyselým alkoholem (1% HCl v 70% ethanolu) a opět opláchne vodou a dobarví se buď methylenovou modří nebo malachitovou zelení. Na modrém pozadí se jeví acidorezistentní bakterie červeně a na zeleném pozadí jsou růžové [8][9]. Jedná se o velice levné vyšetření, které rychle odhalí vážné formy tuberkulózy. Aby byl test pozitivní, musí 1 ml sputa obsahovat 50 000 - 100 000 mykobakterií. Negativní nález TBC nevylučuje. Je třeba provést kultivační test, který je časově náročný neboť mykobakterie dorostou do viditelných kolonií až za 6 – 9 týdnů. Nicméně je metoda kultivace přibližně 1000x citlivější a provádí se po 3, 6 a 9 týdnech [10][11].

V dnešní době se k urychlenému průkazu mykobakterií využívají nové laboratorní techniky. BACTEC je radiometrická kultivační technika, založená na detekci spotřeby kyslíku v průběhu růstu mykobakterií [12]. Metoda PCR (Polymerase Chain Reaction, česky Polymerázová řetězcová reakce) je založena na detekci specifických úseků nukleových kyselin, typických pro konkrétního mykobakteria. MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) prokazuje růst mykobakterií pomocí fluorescence [13].

Diagnózu TBC také můžeme stanovit pomocí tzv. tuberkulinového testu podle Mantoux. Při této metodě se vyšetřovanému podá intradermálně malé množství tuberkulinu do předloktí. Tuberkulin je očištěná bílkovina z *Mycobacterium tuberculosis hominis*, schopná vyvolat reakci protilátek v organismu. Za 48 až 72 hodin se hodnotí ztvrdnutí tkáně (tzv. indurace) v místě vpichu, což odráží imunitní odpověď organismu. V našich podmínkách je tento test pouze orientační z důvodu očkování

populace proti TBC, kdy lze u každého vakcinizovaného pacienta očekávat pozitivní reakci. Indurace do 5 mm představuje negativní nález, 6-10 mm se hodnotí jako pozitivní, tj. postvakcinační, více než 10 mm představuje postinfekční nález a indurace nad 15 mm signalizuje podezření na probíhající tuberkulózní onemocnění [11][14][15].

Dalším testem zjišťující stav buněčné imunity je IGRA (Interferon Gamma Release Assay). Je založený na průkazu interferonu gama z krve pacienta, jež produkují specifické lymfocyty, které přišli do kontaktu s *Mycobacterium tuberculosis*. Krev musí být zpracována do 12 hodin kvůli životaschopnosti leukocytů. Výsledky jsou k dispozici do 24 hodin. Tyto antigeny nejsou přítomny u *Mycobacterium bovis*. IGRA významně přispívá k diagnóze latentní i aktivní TBC [13][16].

Na rentgenovém snímku hrudníku se v případě kavernózní TBC vyskytují neostře ohraničená zastíněná ložiska s kavernózními změnami, eventuálně jizvící plicní změny. U miliární TBC pozorujeme menší infiltráty rozprostřené po obou plicních křídlech [7].

Pacienti nakaženi latentní formou TBC mají pozitivní tuberkulinový kožní test nebo krevní test. Rentgen hrudníku nemusí vykazovat žádné histologické změny nebo zde mohou být známky LTBI, jako jsou kalcifikace nebo zesílení pleury [6].

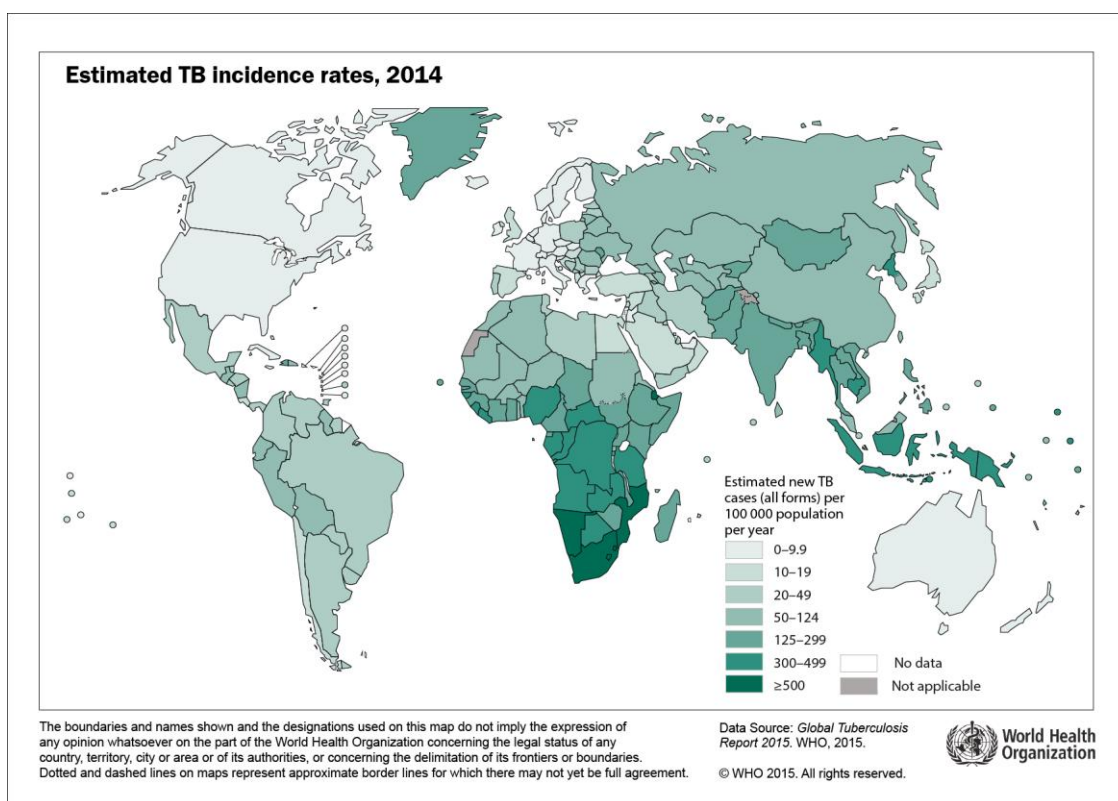
3.4 Etiopatogeneze

Onemocnění TBC je staré již řadu let. Vědci našli stopy nemoci v plicní tkáni tři tisíce let starých egyptských mumií. Všude tam, kde lidé žili ve větší koncentraci, se TBC rozšířila do celé komunity lidí. Téměř před 2500 lety prohlásil Hippokrates, že byla tuberkulóza jednou z nejčastějších onemocnění jeho doby. Věřil, že se nemoc přenáší z jedné osoby na druhou, ale prokázání tohoto tvrzení bude trvat tisíce let [17].

Tuberkulóza je jednou z nejsmrtelnějších bakteriálních infekcí. V roce 2014 na ní zemřelo 1,5 milionu lidí a dalších 6 milionů se nakazilo zejména v rozvojových zemích. Cíl roku 2015, zastavení epidemie TBC, byl úspěšně splněn. Výskyt tohoto onemocnění klesal v průměru o 1,5 % ročně od roku 2000 a nyní je o 18 % nižší než v roce 2000. Úmrtnost klesla o 47 % mezi lety 1900 – 2015 [18].

Vedle HIV/AIDS a malárie je tuberkulóza nejčastější infekční smrtelnou nemocí především v Africe. I v dnešní době existují nedostatky v diagnostice a možnostech léčby. Navíc v posledních letech stále častěji narůstá počet případů nákazy rezistentní a multirezistentní tuberkulózy (MDR-TB, XDR-TB), které jsou odolné vůči léčivům první linie [19]. Důvodem rozšíření TBC ve světě je migrace populace, globální cestování, šíření onemocnění HIV/AIDS, stále vyšší počet multirezistentních kmenů a omezení dohledu a kontroly nad tímto onemocněním [20].

90 % nemocných je v rozvojových zemích, zejména v subsaharské Africe a jihovýchodní Asii. Nejvíce pacientů je v Indii (1 800 000 osob) a Číně (1 400 000 osob). Kontrola TBC v rozvojových zemích závisí především na financích. Bohužel v době snadného cestování je boj s tuberkulózou celosvětovým problémem jak je znázorněno v obrázku č.1 (Odhadovaný výskyt TBC ve světě za rok 2014) [21].



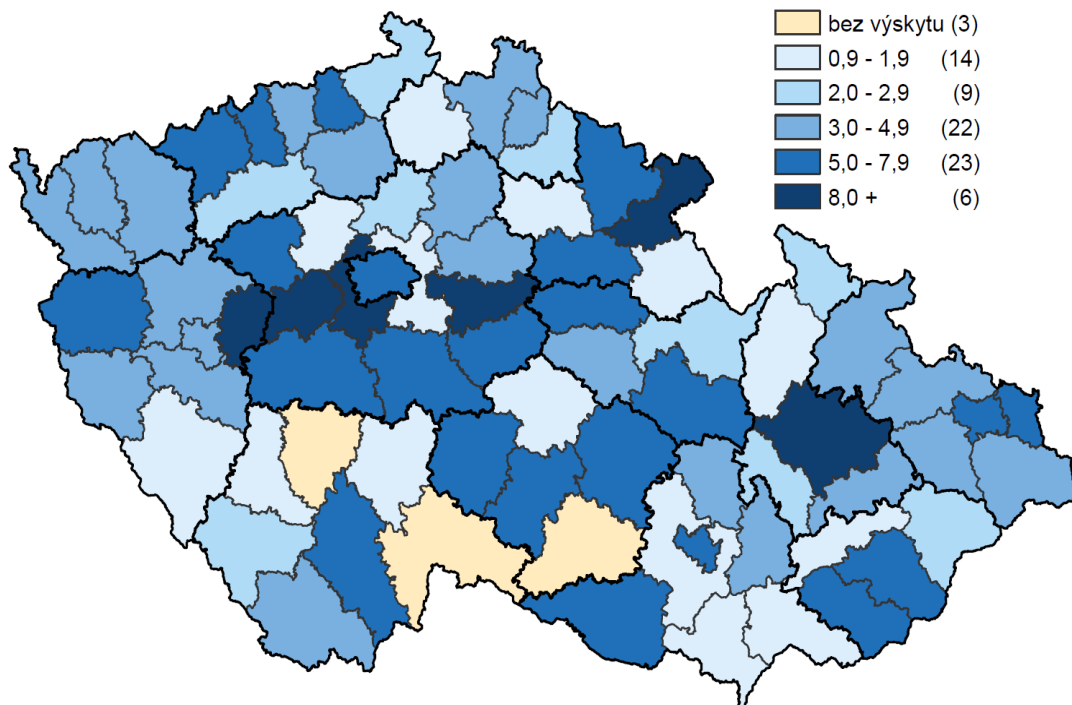
Obrázek č. 1: Odhadovaný výskyt TBC ve světě za rok 2014

[Převzato z: WHO, *Global Tuberculosis report 2015*, [52]]

V České republice je povinnost hlásit veškerá onemocnění způsobená mykobakteriemi, včetně pouhého podezření, do Registru tuberkulózy (RTBC). Zpracovatelem údajů je Koordinační středisko pro resortní zdravotnické informační systémy (KSRZIS), které spadá pod Ministerstvo zdravotnictví.

V roce 2014 bylo hlášeno na RTBC celkem 514 případů nakažení tuberkulózou ve všech formách. U 95 % pacientů byly postiženy plíce, ve zbylých procentech pak lymfatické uzliny, kosti, klouby a močové a pohlavní ústrojí. Průměrný věk nemocných byl 54 let. V ČR postihuje toto onemocnění ženy ve vyšším věku, především 75+, u mužů pozorujeme výskyt již okolo 45. roku života. Děti toto onemocnění postihuje minimálně. V roce 2014 byly hlášeny pouze 4 případy TBC u dětí ve věku 0 - 4 let. Nejvíce pacientů bylo zaznamenáno v Praze (7,8/100 000 obyvatel), dále v kraji Středočeském (5,8/100 000 obyvatel), Pardubickém (5,4/100 000 obyvatel) atd. Republikový průměr onemocnění je 4,8/100 000 obyvatel (Obrázek č. 2: Počet hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel v roce 2014). Část pacientů v ČR

nakažených TBC představovali imigranti ze zemí s vysokým výskytem TBC - celkem 96 případů za rok 2014, především Ukrajinci (22), Vietnamci (20) a Slováci (14), Rumuni atd. Mezi bezdomovci bylo zjištěno 32 případů nákazy [22][23].



Obrázek č. 2: Počet hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel v roce 2014

[Převzato z: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Zdravotnická statistika, Tuberkulóza a respirační nemoci 2014, [22]]

3.5 Terapie

V důsledku hygienických opatření se výskyt tuberkulózy ve střední Evropě podstatně snížil. Nicméně v celosvětovém měřítku je tuberkulóza stále jednou z nejsmrtelnějších infekčních onemocnění. Zejména v rozvojových zemích je dlouhodobá terapie téměř nemožná kvůli nedostatečné zdravotnické infrastruktuře, chybějícím finančním prostředkům a tím související špatné compliance pacientů. Nedostatečná terapie je navíc příčinou rozvoje rezistence mykobakterií na kombinovanou léčbu antibiotik [24].

K léčbě tuberkulózy způsobené nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis* (popřípadě *Mycobacterium bovis*) slouží léčiva zvaná antituberkulotika. Využívají se k léčbě pulmonální i extrapulmonální formy [25]. Léčba TBC musí být nepřerušovaná a dlouhodobá - trvá okolo 6 – 12 měsíců.

V iniciační fázi, tedy v první fázi léčby, se dle doporučení WHO se používá čtyřkombinace léčiv 1. linie – pyrazinamid, isoniazid, rifampicin a ethambutol. Léčba trvá zhruba 2 měsíce a je nutné zahájit v izolovaném lůžkovém zařízení na oddělení pneumologie, aby se snížilo riziko šíření infekce do okolí. Během této doby klesá nakažlivost nemocného na minimum.

Další fází léčby – pokračovací, je již možno provádět ambulantně. Dochází při ní k likvidaci metabolicky málo aktivních mykobakterií (tzv. perzistorů), čímž se snižuje riziko recidivy tohoto onemocnění [11]. V této fázi se nejčastěji po dobu dvou měsíců používá dvojkombinace isoniazid+rifampicin, která může být popřípadě doplněna o další antibiotikum podle mikrobiální citlivosti. U rizikových pacientů se používá trojterapie isoniazid+rifampicin+ethambutol [26]. Doporučené dávkování léčiv 1. linie je uvedeno v Tabulce č. 1: Doporučené dávky antituberkulotik 1. linie pro dospělé.

3.5.1 Léčiva 1. linie

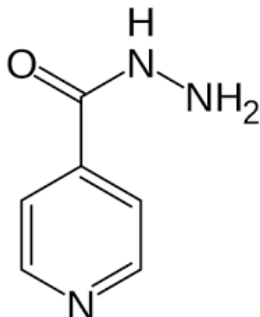
Tabulka č. 1: Doporučené dávky antituberkulotik 1. linie pro dospělé

| Doporučená dávka | | | | |
|---------------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------------|
| | Denně | | 3x týdně | |
| Léčivo | Dávka a rozsah (mg/kg váhy těla) | Maximum (mg) | Dávka a rozsah (mg/kg váhy těla) | Denní maximum (mg) |
| Isoniazid | 5 (4 – 6) | 300 | 10 (8 – 12) | 900 |
| Rifampicin | 10 (8 – 12) | 600 | 10 (8 – 12) | 600 |
| Pyrazinamid | 25 (20 – 30) | | 35 (30 – 40) | |
| Ethambutol | 15 (15 – 20) | | 30 (25 – 35) | |
| Streptomycin ¹ | 15 (12 – 15) | | 15 (12 – 18) | 1000 |

¹ Pacienti, kteří mají přes 60 let, nemusí tolerovat denní dávky vyšší než 500 – 750 mg, proto se u pacientů této věkové kategorie doporučuje redukovat dávky na 10 mg/kg za den. Pacienti s váhou nižší než 50 kg taktéž nemusí tolerovat denní dávky streptomycinu 500 – 750 mg.

[Převzato z: Treatment of tuberculosis guidelines, WHO [27]]

3.5.1.1 Isoniazid (INH)



Nebo-li hydrazid kyseliny isonikotinové, má baktericidní účinky na extra- i intracelulárně působící *Mycobacterium tuberculosis*. Dále je účinný proti atypickým kmenům jako jsou *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium xenopi*.

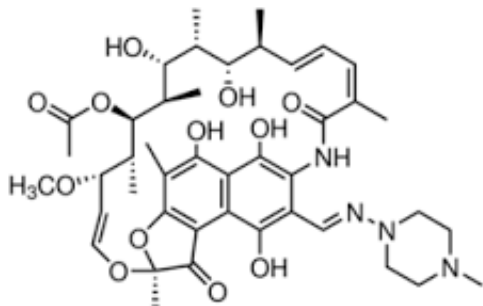
Mechanismus účinku

Jedná se o proléčivo, které se činností mykobakteriálního enzymu katalázy/peroxidázy (KatG) transformuje na aktivní metabolit. Ten se kovalentně váže na NAD⁺ za vzniku produktu, který je silným inhibitorem NADH-dependentní enoyl-ACP reduktázy (InhA). To má za následek zabránění tvorby mykolových kyselin, které jsou nezbytnou součástí buněčné stěny mykobakterií [28].

Nežádoucí účinky

Většinou se jedná o dobře tolerované léčivo, záleží však na velikosti dávky a délce léčby. Vyšší riziko výskytu nežádoucích účinků se objevuje u pomalých acetylátorů. Nejčastější závažnou reakcí na léčbu isoniazidem je hepatitida. Pozorujeme zvýšení transamináz u 10 – 15 % případů a symptomatickou hepatitidu u 0,1-0,15 % případů. Riziko hepatitidy se zvyšuje v těhotenství, u alkoholiků a s přibývajícím věkem. Proto je nutné pacienta během léčby monitorovat [29]. Dalším nežádoucím účinkem léčby isoniazidem je neuropatie. Projevuje se ztrátou paměti, křečemi nebo bolestivými spasmy až atrofií svalů v oblasti hlavy, krku a ramene (tzv. syndrom hlava krk rameno). Tato reakce je způsobena deficitem vitamínu B6 (pyridoxinu), neboť isoniazid zvyšuje exkreci tohoto vitamínu. Z důvodu potlačení těchto nežádoucích příznaků je vhodná suplementace pyridoxinem [25].

3.5.1.2 Rifampicin (RMP)



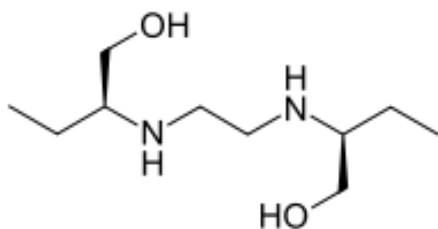
Spolu s rifabutinem je řadíme mezi širokospektrá antibiotika, respektive ansamyciny. Původní molekula rifampicinu pochází ze *Streptomyces mediterranei*. Působí baktericidně především na G⁺, ale i na G⁻ bakterie. Mimo léčbu TBC se také využívá v kombinovaných režimech při léčbě stafylokokových infekcí (osteomyelitida, endokarditidy) i na léčbu lepry [30].

Mechanismem účinku je blokáda DNA-dependentní RNA-polymerázy bakterií. Snadno proniká do tkání, abscesů i fagocytujících buněk. Z důvodu vysokého rizika vzniku rezistence jej nelze užívat v monoterapii [25].

Nežádoucí účinky

Jedná se o poměrně dobře tolerované léčivo. Mohou se vyskytovat alergické kožní reakce i příznaky podobné chřipce. Rifampicin je taktéž hepatotoxický, i když v menší míře než isoniazid. Tělesné sekrety včetně stolice zabarvuje oranžovo-červeně. Při jeho užívání vzniká určité riziko pseudomembranózní kolitidy. Rifampicin je významným induktorem cytochromu P450 i P-glykoproteinu a tím snižuje účinky celé řady léčiv, např. perorální kontracepce, digoxinu, blokátorů kalciových kanálů, statinů apod. [25][31].

3.5.1.3 Ethambutol (EMB)



Je považován za bakteriostatický, ale v kombinaci s jinými léčivy se zvyšuje baktericidní potenciál. Je účinný na *MT* i ostatní „netuberkuloidní“ mykobakterie. Využívá se s úspěchem při rezistenci vůči jiným léčivům.

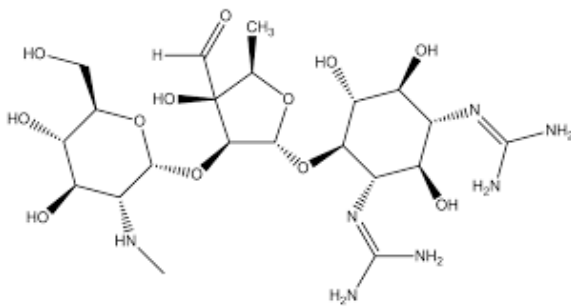
Mechanismus účinku

EMB inhibuje polymeraci arabinosy na arabinan a tím ovlivňuje syntézu arabinogalaktanu, který je součástí buněčné stěny mykobakterií. Dochází tedy k poruše její syntézy a tím i zvyšuje penetrabilitu ostatních antituberkulotik [32].

Nežádoucí účinky

Jsou přímo závislé na velikosti dávky a délce terapie EMB. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je vznik retrobulbární neuritidy s poruchami vidění a barvocitu. Popisuje se snížení zrakové ostrosti, omezení zorného pole a ztráta vidění zelené a červené barvy. Je to poměrně vzácný jev a většinou reverzibilní. Přesto je vhodné před zahájením terapie provést vyšetření perimetru a barvocitu a dále provádět během terapie pravidelné kontroly u očního lékaře ve čtyřtýdenních intervalech. Dalším nežádoucím projevem terapie může být leukopenie, alergické projevy, poškození ledvin, snížené vylučování kyseliny močové s následnými záchvaty dny a přechodné projevy jaterního poškození. Není však pokládán za hepatotoxické léčivo [33].

3.5.1.4 Streptomycin (STM)



Je aminoglykosid získaný ze *Streptomyces griseus*. Obsahuje ve své struktuře aminocukry spojené glykosidickými vazbami. Působí baktericidně na extracelulárně uložená mykobakteria a je také účinný na infekce

způsobené aerobními G- bakteriemi. Používá se parenterálně při těžkých formách TBC, i při meningitidě. Nevýhodou je, že na STM vzniká rychle rezistence. Z tohoto důvodu se používá v kombinaci [25][30].

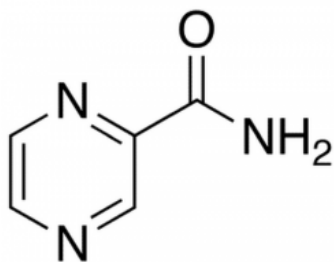
Mechanismus účinku

Pomocí aktivního transportu se přenáší do cytoplazmy bakterií, kde se ireverzibilně váže na 30S podjednotku ribozomu a tím inhibuje syntézu bílkovin [34].

Nežádoucí účinky

Nejzávažnějším účinkem je poškození 8. mozkového nervu. To se zpočátku projevuje postižením vestibulárního aparátu a později poškozením nervus acusticus. Toto poškození se projevuje rušivými šelesty, hluchotou i poruchami rovnováhy. Při denní dávce 1g STM, se tato komplikace vyskytuje u 10-20 % pacientů. Při dvojnásobné dávce, tedy 2g STM denně, se tato porucha projevuje již u 80 % pacientů. Z tohoto důvodu se STM v iniciální fázi používá jen po dobu maximálně 3 měsíců [33]. Dalším nežádoucím účinkem může být nefrotoxicita a je třeba vyšší opatrnosti u léčby pacientů se selháváním ledvin, protože se STM vylučuje ledvinami v prakticky nezměněné podobě.

3.5.1.5 Pyrazinamid (PZA)



Tento derivát nikotinamidu je nezbytnou součástí krátkodobé antituberkulózní chemoterapie. Jeho aktivita byla objevena v roce 1952. Zkracuje dobu léčby na 6 měsíců a také snižuje četnost relapsů. Působí baktericidně na *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium africanum*, zatímco ostatní původci jako například *Mycobacterium bovis* jsou většinou rezistentní.

Mechanismus účinku

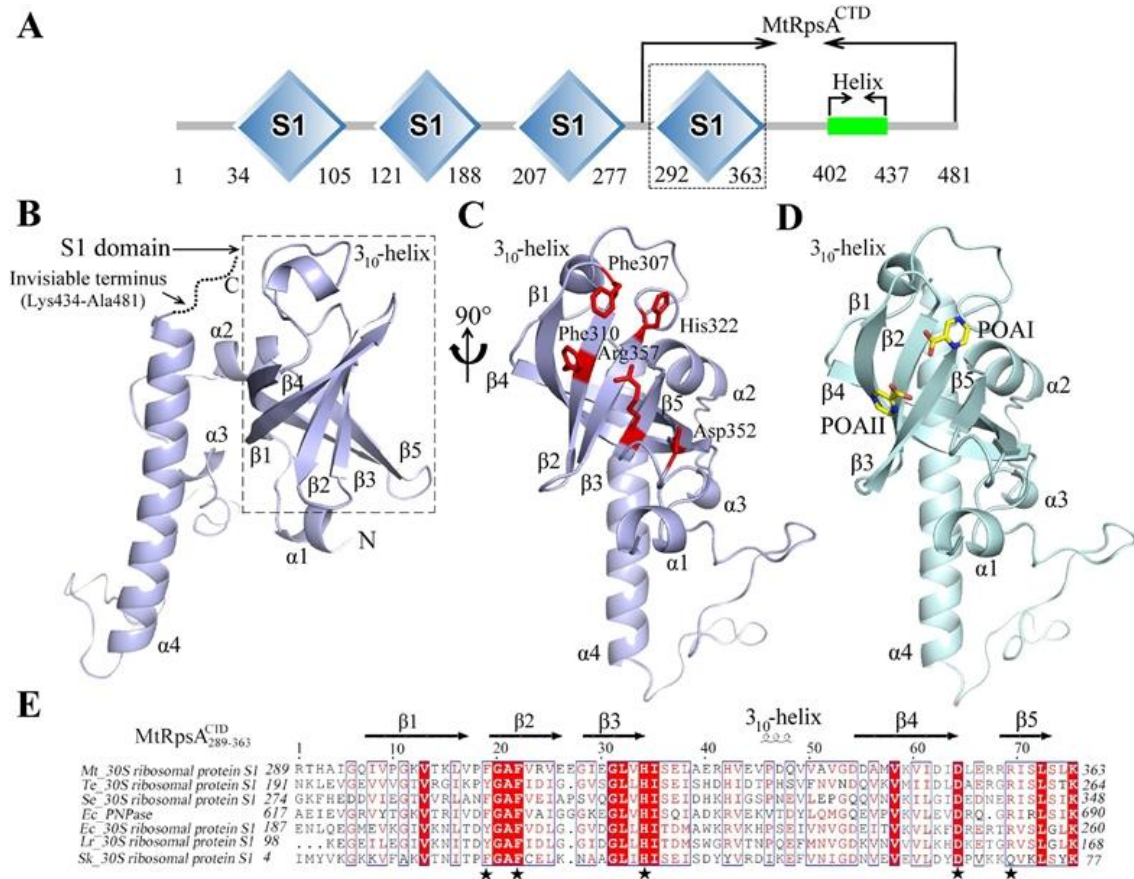
Mechanismus působení pyrazinamidu není přesně znám. PZA je proléčivo, které pasivní difúzí pronikne do mykobakteria, kde se působením pyrazinamidasy hydrolyzuje na aktivní kyselinu pyrazinovou (POA). Tato kyselina se váže intracelulárně na syntasu mastných kyselin (FAS - I) kompetitivně s NADPH, což má za následek inhibici syntézy mastných kyselin. Tím dojde k narušení buněčné membrány mykobakteria [35][36]. V neutrálním prostředí je PZA téměř neaktivní. Je prokázáno, že je PZA vysoce účinný jen při nízkém extracelulárním pH (pod 5,5) a při nízkých hustotách buněk. Proto je vhodný proti organismům vyskytujících se v kyselém prostředí plic, které vznikne během časně fáze zánětlivé reakce. Jak již bylo řečeno, většina mykobakterií je proti působení PZA rezistentní, jelikož mají tyto bakterie schopnost vylučovat POA ven z buňky pomocí aktivního efluxu, což způsobuje její nedostatečnou aktivitu [37].

Substituce pyrazinu v poloze 5 zejména chlorace, vedla k dramatickému zlepšení účinnosti PZA analogů v inhibici FAS-I proti *M. tuberculosis*. Zjištění, že 5-chlorpyrazinamid je silný inhibitor FAS-I i buněčného růstu poukázalo na nezbytnost dalšího vývoje nových antituberkulotik založených na substituci pyrazinového jádra [38].

Další vysvětlením mechanismu účinku je vazba POA na ribozomální protein S1 (tzv. RpsA) přes vodíkové vazby a hydrofobní interakce zprostředkované především zbytky

(Lys434-Ala481, Phe307, His322, Asp352, Arg357), které jsou nezbytné pro vazbu tmRNA (viz Obrázek č. 3).

Tento děj vede k inhibici trans-translace, což je ochranný proces bakterií při záchraně pozastavených ribozomů [39].



Obrázek č. 3: Struktura ribozomálního proteinu S1 a jeho komplexu s POA

[Převzato z: YANG, LIU 2015 [39]]

V dnešní době se klade větší důraz na estery kyseliny pyrazinové (POE). Jelikož se díky činnosti esteráz rozkládají na POA, obchází se tím potřeba amidázy. Bylo totiž prokázáno, že amidáza není nezbytná pro aktivitu PZA. Díky tomu jsou POE nejen účinnější proti PZA-rezistentním mykobakteriím, ale také aktivnější než pyrazinamid proti PZA-citlivým kmenům *M. tuberculosis*. POES jsou také aktivní proti přirozeně PZA-rezistentní *M. bovis*, který postráda amidasu. Ale aktivita esterů proti POA-rezistentní *M. smegmatis* a *M. avium*, kde je rezistence založena na činnosti efluxní pumpy naznačuje, že antimykobakteriální aktivita POES nezávisí na konverzi na POA. Dále bylo prokázáno, že na rozdíl od PZA nebo POA, jsou POE aktivní v neutrálním prostředí.

Proto nejsou POE pokládány jen za alternativní proléčiva, ale pravděpodobně mají vnitřní antimikrobiální aktivitu bez potřeby hydrolyzy na kyselinu [38].

V poslední době byl objeven nový gen panD kódující aspartátdekarboxylasu. Podílí se na syntéze panthotenátu (vitamínu B5), který je potřebný pro syntézu koenzymu A (CoA), jakožto centra energetického metabolismu. Předpokládá se, že POA působí inhibicí toho genu, který je taktéž zodpovědný za resistenci MT na PZA [40].

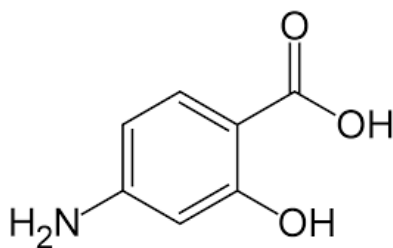
Nežádoucí účinky

Hlavním nežádoucím účinkem jsou gastrointestinální potíže a bolest kloubů. Dále PZA způsobuje zvýšení koncentrace kyseliny močové v plazmě, což ale nevede k rozvoji dny. Ve skutečnosti normální hodnoty kyseliny močové v plazmě při terapii pyrazinamidem naznačují non-compliance pacienta. Vážnější komplikací terapie je hepatotoxicita, která dramaticky narůstá s vyššími denními dávkami. Riziko poškození jater se dále zvyšuje kombinací PZA s dalšími antituberkulotiky (např. INH). U pacientů léčených PZA, INH a RMP lze pozorovat zvýšení aktivity sérových transamináz, což může být způsobeno rifampicinem jakožto enzymovým induktorem [41]. PZA je také spojován s neočekávanými závažnými poranění jater, především v dvojterapii s rifampicinem při léčbě latentní infekce [36].

3.5.2 Léčiva 2. linie

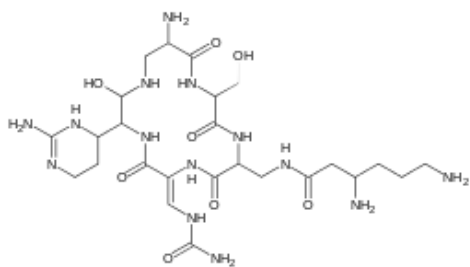
Používají se v případě, kdy nelze sestavit vhodný léčebný program z léčiva 1. linie, např. z důvodu rezistence nebo nežádoucích účinků.

3.5.2.1 Kyselina para-aminosalicylová (PAS)



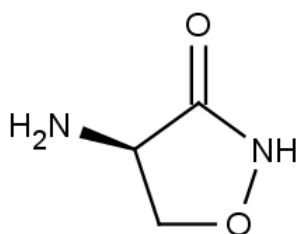
Je strukturální analog kyseliny paraaminobenzoové. Dříve byla tato kyselina často používaná při terapii TBC. Má bakteriostatický účinek. Mechanismus účinku není zcela znám. Předpokládá se, že působí inhibiči dihydrofolátreduktasy, čímž brání syntéze kyseliny listové [42].

3.5.2.2 Kapreomycin



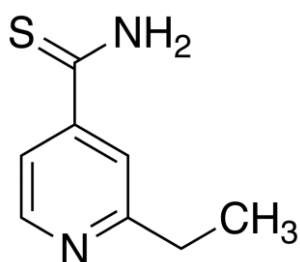
Řadí se mezi peptidová antibiotika. Působí baktericidně inhibiči proteosyntézy. Má často zkříženou rezistenci s viomycinem, méně pak se neomycinem a kanamycinem. Má vážné nežádoucí účinky, jako jsou poškození ledvin, dysfunkce vestibulárního aparátu, elektrolytická dysbalance [43].

3.5.2.3 Cykloserin (CS)



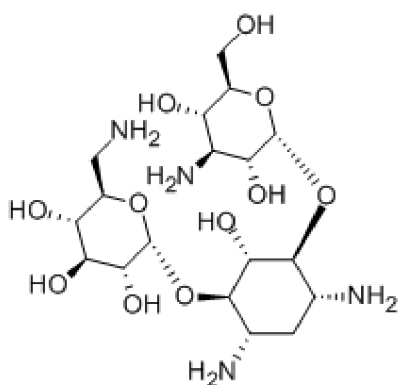
Je to přírodní produkt získaný ze *Streptomyces orchidaceus* a *Streptomyces garyphalus*. Má bakteriostatické účinky. Narušuje začlenění D-alaninu do peptidoglykanu během syntézy bakteriální buněčné stěny. Mechanismus účinku je podobný působení β -laktámů. Problémem terapie CS je častá neurotoxicita zahrnující vyšší dráždivost nervů, závratě, letargii, deprese, úzkost apod. [36]

3.5.2.4 Ethionamid (ETA)

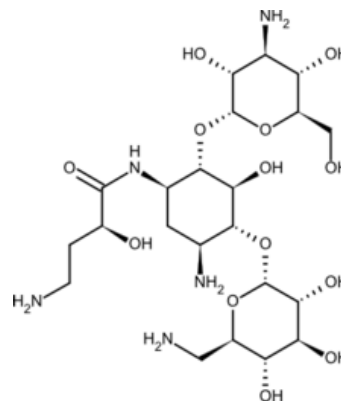


Využívá se pro léčbu multirezistentní TBC. Chemickou strukturou se podobá fenylthiomočovině, což je známý inhibitor tyrosinkinasy. Po porovnání inhibičních účinků na tyrosinkinasu hub bylo zjištěno, že ETA a jeho analogy mají také tyto inhibiční vlastnosti [44]. Mezi nežádoucí účinky patří nauzea, zvracení, intolerance GIT. Může také způsobit vytvoření strumy se vznikem nebo i bez vzniku hypotyreózy. Toxickým projevem terapie může být i gynekomastie, alopecie, impotence, menorrhagie a fotodermatitida [36].

3.5.2.5 Aminoglykosidy – kanamycin (KM), amikacin (AC)



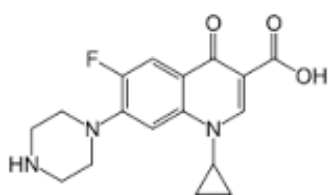
Kanamycin



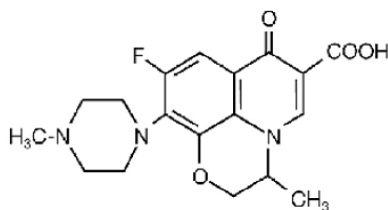
Amikacin

Kanamycin a amikacin jsou klíčová aminoglykosidová léčiva používaná při léčbě tuberkulózy. Mají rychlý baktericidní účinek. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin. Aminoglykosidy se ireversibilně vážou na 30 S podjednotku ribozomu a tím brání vazbě aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na komplexu mRNA-ribozom. Riziko nežádoucích účinků zvyšují četné interakce s látkami, u kterých dochází k potenciaci nežádoucích účinků. Jedná se o projevy nefrotoxicity, ototoxicity a neurotoxicity (furosemid, cisplatina apod. [45]. Problémem terapie KM a AC je také rezistence na léčbu. Opakovaně byla prokázána i zkřížená rezistence mezi KM a AC. Mechanismy spojené s odolností vůči aminoglykosidům jsou vysvětlovány mutací v ribozomálním proteinu rRNA, mutací ve vychytávání léčiv, nepropustnosti buněčné stěny, enzymatické modifikaci léčiv a efluxní pumpě [46].

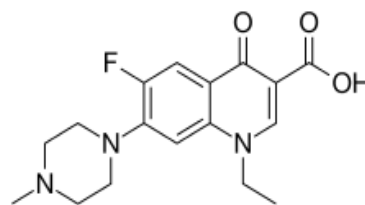
3.5.2.6 Fluorchinolony – ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin, gatifloxacin



Ciprofloxacin



Ofloxacin



Pefloxacin

Chemicky to jsou chinolony s četnými substitucemi. Působí baktericidně inhibicí DNA-gyrázy, která je zodpovědná za správné zřetězení a rozvolnění superhelikální DNA během replikace. Její inhibice proto znemožňuje syntézu nukleových kyselin. K bakteriální rezistenci dochází mutací chromozomů, které mění gyrázu DNA. K nežádoucím účinkům patří především GIT obtíže, které zahrnují bolesti břicha, nevolnost, zvracení a průjem. Vzácnějším NÚ (až u 29 % pacientů) je neurotoxicita projevující se bolestí hlavy, závratěmi, neklidem, poruchami spánku [47][48].

V dnešní době se testují nové fluorchinolony s nižší hodnotou MIC pro TBC. Tyto látky často obsahují methoxyskupinu v poloze 8. Problémem pro jejich široké využití je toxicita. Sitafoxacin a sparfoxacin jsou fototoxické a slibný gatifloxacin způsobuje problémy s hypoglykemií a hyperglykemií především u starších pacientů [49].

3.6 Rezistence

Vznik prvních případů rezistence se datuje do roku 1943, kdy Seman Waksman objevil streptomycin. Po krátké době několika měsíců léčby streptomycinem došlo k poklesu terapeutické účinnosti právě vznikem rezistence. Mechanismus vzniku může být různý, od nesprávně zvoleného léčebného programu, špatné dávky až po non-compliance pacienta či mutace genu mykobakterií. Globální dohled nad tuberkulózou ukázal, že rezistence léčiv proti TBC je velmi rozšířená. To představuje hrozbu pro péči a kontrolu TBC v mnoha zemích [50].

Monorezistentní TBC je označováno tehdy, je-li mykobakterium rezistentní na jedno léčivo 1. linie antituberkulotik. Polyrezistentní formy jsou vyvolány kmeny mykobakterií, které jsou rezistentní na dvě nebo více antituberkulotik. Polyrezistence je charakterizována jako rezistence na dvě nebo více léčiv první linie [11].

Nejzávažnější formou je multirezistence (MDR-TB), což představuje necitlivost kmene mykobakteria na dvě nejúčinnější antituberkulotika – isoniazid, rifampicin. První případ byl zaznamenán v roce 1970, kdy byl do terapie TBC zaveden rifampicin. WHO odhaduje, že v roce 2014 se MDR-TB rozvinula u 480 000 pacientů, což ze 6 000 000 nahlášených nových případů TBC představuje 8%. Z toho 190 000 zemřelo. Současné léčebné programy pro pacienty MDR-TB nejsou uspokojivé. Obvykle vyžadují aspoň 20 měsíců léčby kombinací léčiv 2. linie, které jsou toxické a méně efektivní než léčiva 1. linie. Globální kohortová studie z roku 2012 zjistila, že se úspěšně vyléčilo pouze 50 % pacientů s MDR-TB [51].

Kromě multirezistentních forem se v poslední době objevují i případy extenzivně rezistentních kmenů mykobakterií (XDR-TB), což je kombinace multirezistence, odolnosti na jakýkoli fluorochinolon a na jeden ze tří injekčně aplikovaných léků (kapreomycin, kanamycin a amikacin). V průměru se odhaduje, že 9,7 % případů MDR-TB má XDR-TB. Léčebné možnosti pro pacienty s XDR-TB jsou ještě více omezeny než u MDR-TB. Ze skupiny 200 pacientů s XDR-TB ve 14 zemí bylo vyléčeno pouze 33 % [52].

Kromě výše uvedených problémů, mohou léčiva 2. linie interagovat s jinými léčivy pro terapii komorbidit často spojených s TBC, jako například HIV infikovaných jedinců. Tyto lékové interakce mohou být zodpovědné za omezení účinnosti léků nebo způsobit zvýšenou orgánovou toxicitu. Z tohoto důvodu je velmi důležité klást důraz na oblast výzkumu a vývoje nových léků a léčebných režimů TBC [51][53].

3.7 Vakcinace

Využívá se v prevenci TBC, nelze ji použít k léčbě onemocnění. V současné době má jediné oprávnění k použití BCG vakcína, což je oslabený kmen *Mycobacterium bovis* známý jako Bacille Calmette-Guerin. Toto očkování je v ČR od roku 2010 nepovinné. Patří mezi první očkování prováděná 3. – 5. den po narození. Má 60 – 80 % ochranný účinek proti závažné formě TBC u dětí, zejména meningitidy. Její efekt trvá přibližně 10 let. Tato vakcína je bohužel zastaralá. Poprvé byla použita perorálně téměř před 100 lety v roce 1921. Přiznává se pouze proměnná a neúplná ochrana proti plicní TBC a je kontraindikována u dětí nakažených virem HIV. Přesto je pokrytí vakcinace vysoké především v rozvojových zemích. V dnešní době se vyvíjí nové vakcíny se slibnými výsledky v preklinickém testování. Cílovými skupinami obyvatelstva jsou právě dospělí a děti nakažení virem HIV [54][55].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité postupy, chemikálie, přístroje

Experimentální část mé práce probíhala v laboratoři na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Pokud není uvedeno jinak, výchozí látky a ostatní chemikálie pocházely od společnosti Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) a byly použity v dodané kvalitě.

Pro kontrolu průběhu reakcí a čistoty produktů jsem využívala metodu tenkovrstvé chromatografie (TLC). Mobilní fáze měla složení hexan – ethylacetát v poměru 2:1. Používala jsem TLC desky Silica 60 F₂₅₄ od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Detekce byla prováděna pod UV lampou emitující záření o vlnové délce 254 a 366 nm.

Preparativní chromatografie produktů byla prováděna na automatizovaném chromatografu CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA). Stacionární fází byl silikagel (Silicagel 60, 0,040, 0,63 mm, Merck, Darmstadt, Německo).

¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla naměřena na katedře Anorganické a organické chemie (KAOCH), Farmaceutické fakulty doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. K měření byl použit spektrometr Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA), při frekvenci 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C nebo Varian Mercury VX-BB 300 při frekvenci 300 MHz pro ¹H a 75 MHz pro ¹³C. Spektra byla zaznamenávána v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-d₆) nebo deuterovaném chloroformu (CDCl₃) při laboratorní teplotě. Chemické posuny δ (ppm) jsou vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) a to nepřímo přes referenční signály rozpouštědla (pro DMSO 2,50 ppm v ¹H spektru a 39,70 ppm v ¹³C spektru; pro CDCl₃ 7,26 ppm v ¹H spektru a 77,0 v ¹³C spektru).

Infračervená spektra byla změřena na KAOCH pomocí přístroje Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) za použití metody ATR (zeslabený úplný odraz) na krystalu germania.

Elementární analýza většiny produktů byla provedena za použití analyzátoru Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Německo). Fluorované produkty (JZ-AM8 a JZ-AM24) byly analyzovány na analyzátoru EA-1110 CHN (CE Instruments, Wigan, Velká Británie).

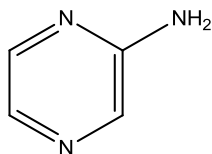
Teploty tání byly stanoveny kapilární metodou pomocí bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Velká Británie) a nejsou korigovány.

Pro zjištění lipofility produktů byly vypočteny jejich hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$ pomocí programu CS ChemBioOffice Ultra, verze 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Vzorce byly nakresleny rovněž pomocí programu CS ChemBioOffice Ultra, verze 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

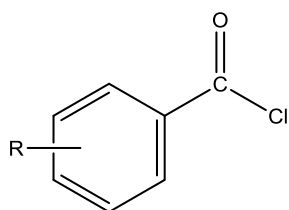
4.2 Výchozí látky

Všechny konečné produkty syntézy I byly připravené z různých na jádře substituovaných benzoylchloridů a 2-aminopyrazinu.



2-aminopyrazin

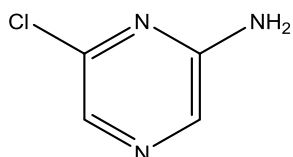
(98%, Sigma-Aldrich)



substituované benzoylchloridy

(Sigma-Aldrich)

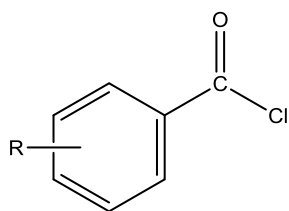
Všechny konečné produkty syntézy II byly připravené z různých na jádře substituovaných benzoylchloridů a 6-chlor-2-aminopyrazinu.



2-amino-6-chlorpyrazin

6-chlorpyrazin-2-amin

(97%, Synthonix, Wake Forest, NC, USA)



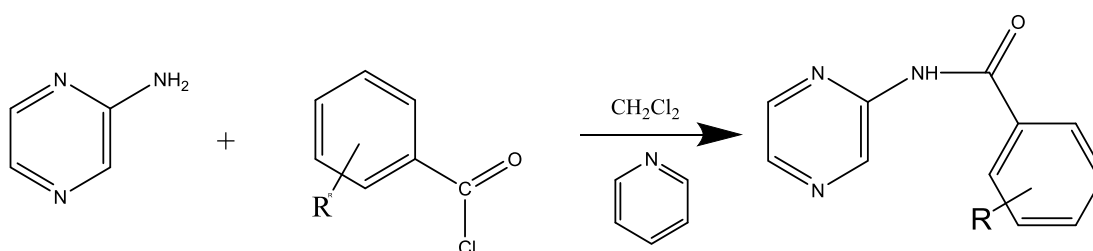
substituované benzoylchloridy

(Sigma-Aldrich)

4.3 Příprava nových látek

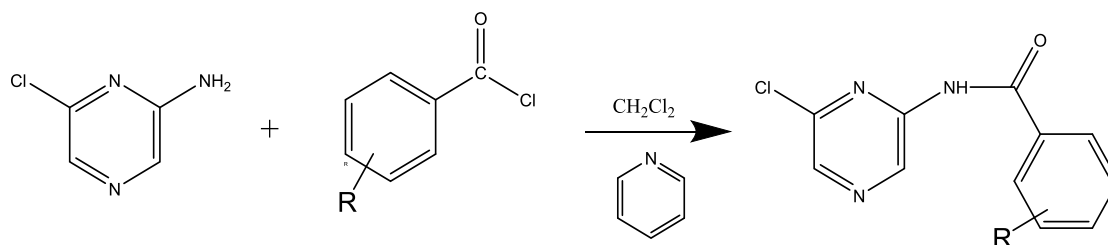
Při syntéze první sady látek (tzv. Syntéza I) se směs 6 mmol (3 molární ekvivalenty) pyridinu s 2 ml dichlormethanu (DCM) ochladila v mrazničce na přibližně 0 °C. Do této směsi se za stálého míchání přidalo 2,4 mmol (1,2 molární přebytek) benzoylchloridu naředěného 5 ml dichlormethanu. Po 5 minutách stálého míchání se do směsi přikapával po dobu 10 minut 2 mmol (1 molární ekvivalent) 2-aminopyrazinu rozpuštěný ve 2 ml dichlormethanu. Po celou dobu reakce byly prováděny kontroly pomocí TLC s mobilní fází hexan – ethyl-acetát v poměru 2:1 a po detekci dostatečného množství produktu byla reakce ukončena. Reakce trvala přibližně 2 hodiny.

Poté byl do reakční směsi přidán silikagel a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Takto naadsorbovaná reakční směs byla podrobena flash chromatografií pomocí chromatografu CombiFlash®Rf. Mobilní fází byla směs hexan – ethyl-acetát, monitorovací vlnová délka 260 nm, detekční vlnová délka 280 nm a rychlost průtoku mobilní fáze 35 ml/min. Eluce byla gradientová v rozmezí 0–50% ethyl-acetátu v hexanu. Pomocí TLC se zkontrolovala čistota produktu v konkrétních frakcích (zkumavkách). Ty, co obsahovaly produkt, byly slity dohromady a opět se odpařilo rozpouštědlo na vakuové odparce. V případě potřeby se provedla rekrytalizace ze směsi etanolu a vody. V případě nežádoucího (obvykle nahnědlého) zabarvení se produkt dispergoval v minimálním množství hexanu, vložil se filtrační papír a zabarvení vzlínalo nahoru. Následně byl produkt poslán k závěrečné analýze na NMR a určila se teplota tání a retenční faktor konečné látky. Schéma přípravy je znázorněno na Obrázku 4.



Obrázek č. 4: Obecné schéma přípravy I

Syntéza tedy druhé sady látek (Syntéza II) probíhala dle stejného postupu jako syntéza I s tím rozdílem, že místo 2-aminopyrazinu jsme přidávali 2-amino-6-chlorpyrazin (Obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Obecné schéma přípravy II

U látek s acetoxykupinou (JZ-AM13) se dále prováděla hydrolyza esterové vazby za vzniku OH skupiny. Ester kyseliny se za tepla rozpustil v etanolu a poté se k němu přidalo 5 molárních ekvivalentů (nadbytek) uhličitanu draselného. Reakci jsme nechali 2 hodiny míchat. Průběh reakce jsme sledovali na TLC. Takto byla připravena sloučenina JZ-AM14 hydrolyzou sloučeniny JZ-AM13.

4.4 Nově připravené látky

4.4.1 4-chlor-*N*-(-4-chlorbenzoyl)-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM2 (nechtěný vedlejší produkt)

Sumární vzorec: C₁₈H₁₁Cl₂N₃O₂

Molekulová hmotnost: 372,21

log *P*: 3,84

Clog *P*: 4,49126

R_f: 0,446

Teplota tání: 153,1-153,8 °C

Výtěžek reakce:

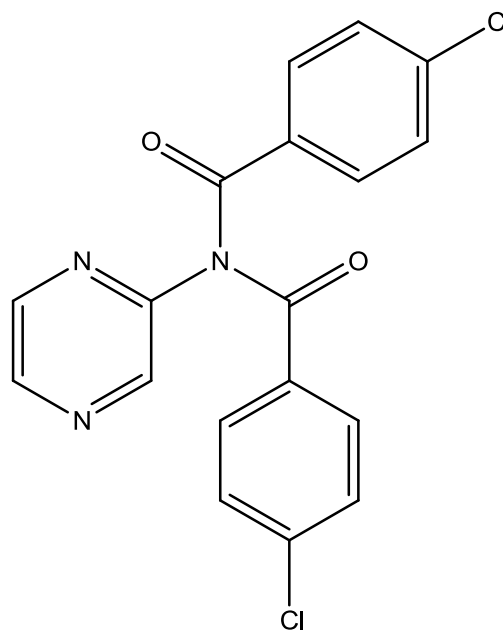
- **teoretický:** 372,31 mg (dle množství aminopyrazinu)
- **praktický:** 225,5 mg (61 %)

Elementární analýza:

- **výpočet:** C 58.09 %; H, 2.98 %; N 11.29 %
- **nalezeno:** C 58.5 %; H 2.91 %; N 11.15%

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.45 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.35 (dd, *J* = 2.4, 1.5 Hz, 1H, H6'), 7.72 – 7.63 (m, 4H, ArH), 7.38 – 7.33 (m, 4H, ArH).

IČ spektrum: 1703 (C=O, CONH); 1590; 1403; 1269; 1240; 1113; 1089; 1011; 920; 872; 845; 754



4.4.2 4-methoxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM3

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁N₃O₂

Molekulová hmotnost: 229,24

log *P*: 0,75

Clog *P*: 1,40779

R_f: 0,107

Teplota tání: 156,0-156,6 °C

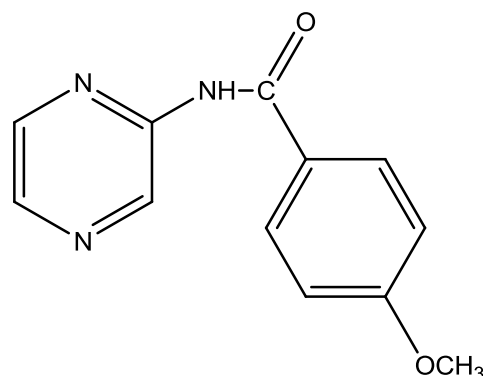
(157-159 °C dle lit. [66])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 458,46 mg
- praktický: 64,4 mg (14 %)

Elementární analýza:

- výpočet: C 62,87 %; H 4,84 %; N 18,33 %
- nalezeno: C 62,58 %; H 4,83 %; N 17,95 %



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.70 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.68 (bs, 1H, NH), 8.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5'), 8.23 – 8.19 (m, 1H, H6'), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H2, H6), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H3, H5), 3.87 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.95, 163.09, 148.49, 141.94, 140.02, 137.24, 129.36, 125.42, 114.10, 55.48.

IČ spektrum: 3304; 3116; 2927; 2844; 1663 (C=O, CONH); 1508; 1414; 1299; 1249; 1173; 1026; 1012; 835; 759; 656

4.4.3 3-chlor-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM4

Sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O

Molekulová hmotnost: 233,66

log *P*: 1,44

Clog *P*: 2,0515

R_f: 0,214

Teplota tání: 147,2-149,4 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 467,3 mg
- praktický: 162 mg (35 %)

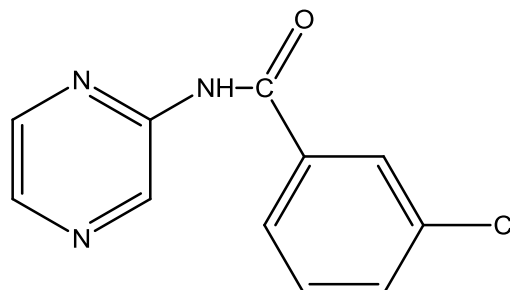
Elementární analýza:

- výpočet: C 56,55 %; H 3,45 %; N 17,98 %
- nalezeno: C 56,16 %; H 3,44 %; N 17,87 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.69 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H3'), 8.71 (bs, 1H, NH), 8.38 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.25 (bs, 1H, H6'), 7.93 (s, 1H, H2), 7.80 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H6), 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4), 7.45 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.18, 148.04, 142.08, 140.62, 137.26, 135.21, 135.14, 132.66, 130.22, 127.78, 125.33

IČ spektrum: 3178; 3107; 3069; 1680 (C=O, CONH); 1545; 1414; 1305; 1262; 1058; 1018; 846; 765; 725



4.4.4 3-methoxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM5

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁N₃O₂

Molekulová hmotnost: 229,24

log *P*: 0,75

Clog *P*: 1,40779

R_f: 0,161

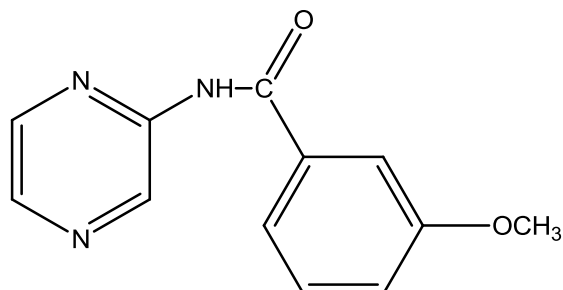
Teplota tání: 148,1-150,1 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 458,46 mg
- praktický: 101,0 mg (22 %)

Elementární analýza:

- výpočet: C 62,87 %; H 4,84 %; N 18,33 %
- nalezeno: C 63,08 %; H 4,83 %; N 18,01 %



¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.71 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.71 (bs, 1H, NH), 8.36 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.24 – 8.20 (m, 1H, H6'), 7.50 – 7.43 (m, 2H, ArH), 7.40 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.12 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H, ArH), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.35, 160.04, 148.26, 142.02, 140.33, 137.24, 134.79, 129.90, 119.05, 118.88, 112.64, 55.48.

IČ spektrum: 3171; 3110; 3003; 2976; 1673 (C=O, CONH); 1544; 1417; 1300; 1277; 1235; 1033; 1017; 797; 740

4.4.5 4-acetoxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM6

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁N₃O₃

Molekulová hmotnost: 257,24

log *P*: 0,47

Clog *P*: 0,837795

R_f: 0,107

Teplota tání: 147,4-149,4 °C

(158 °C dle lit. [67])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 514,48 mg
- praktický: 70,9 mg (14 %)

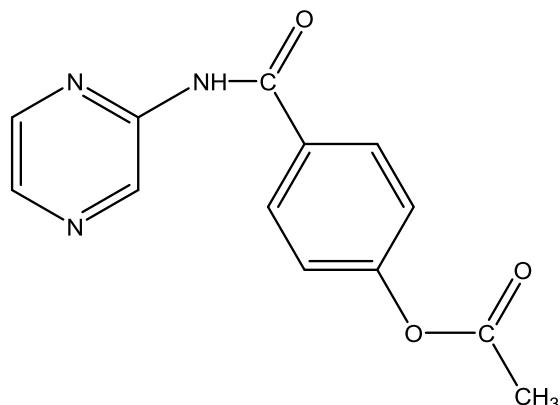
Elementární analýza:

- výpočet: : C 60,70 %; H 4,31 %; N 16,33 %
- nalezeno: C 60,23 %; H 4,17 %; N 15,98 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.70 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H3), 8.70 (bs, 1H, NH), 8.37 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H5), 8.22 (bs, 1H, H6), 7.96 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H2', H6'), 7.24 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H3', H5'), 2.33 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.82, 164.60, 153.95, 148.22, 142.02, 140.41, 137.24, 130.86, 128.90, 122.16, 21.10.

IČ spektrum: 3171; 3107; 3046; 1753 (C=O, COOR); 1672 (C=O, CONH); 1541; 1504; 1417; 1300; 1209; 1166; 1015; 916; 843; 757; 704



4.4.6 2-hydroxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM7

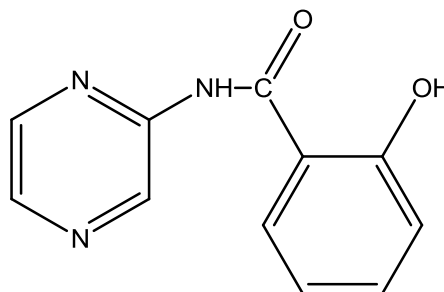
Sumární vzorec: C₁₁H₉N₃O₂

Molekulová hmotnost: 215,21

log *P*: 0,49

Clog *P*: 1,936

R_f: 0,161



Teplota tání: 209,9-211,5 °C (dle lit. 216 °C [67])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 430,42 mg
- praktický: 289,4 mg (67 %)

Elementární analýza:

- výpočet: C 61,39 %; H 4,22 %; N 19,53 %
- nalezeno: C 61,24 %; H 4,12 %; N 19,13 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.77 (bs, 1H, OH), 11.01 (s, 1H, NH), 9.51 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3'), 8.43 (dd, *J* = 2.5, 1.5 Hz, 1H, H6'), 8.42 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.03 (dd, *J* = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H2), 7.49 – 7.44 (m, 1H, H4), 7.06 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, H3), 7.03 – 6.98 (m, 1H, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.47, 156.91, 148.52, 142.99, 140.37, 136.82, 134.46, 130.96, 120.04, 117.84, 117.31.

IČ spektrum: 3274; 2933; 2566; 1669 (C=O, CONH); 1538; 1449; 1417; 1301; 1222; 1149; 1063; 1012; 839; 759; 689

4.4.7 3-(trifluormethyl)-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM8

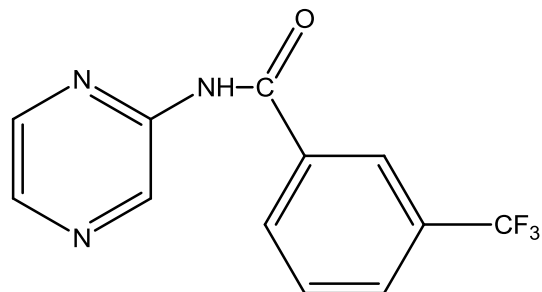
Sumární vzorec: C₁₂H₈F₃N₃O

Molekulová hmotnost: 267,21

log *P*: 1,8

Clog *P*: 2,24002

R_f: 0,23



Teplota tání: 160,9-161,6 °C (dle lit. 159-161°C [68])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 267,21 mg (příprava z 1 mmol aminopyrazinu)
- praktický: 56,7 mg (21 %)

Elementární analýza:

- výpočet: C 53,94 %; H 3,02 %; N 15,73 %
- nalezeno: C 54,02 %; H 2,83 %; N 15,49 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.70 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H3'), 8.80 (bs, 1H, NH), 8.40 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.28 – 8.25 (m, 1H, H6'), 8.21 (s, 1H, H2), 8.13 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ArH), 7.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H5).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.10, 147.98, 142.11, 140.74, 137.29, 134.26, 131.59 (q, *J* = 33.1 Hz), 130.54, 129.63, 129.19 (q, *J* = 3.6 Hz), 124.49 (q, *J* = 3.8 Hz), 123.46 (q, *J* = 272.7 Hz).

IČ spektrum: 3177; 3107; 1681 (C=O, CONH); 1548; 1419; 1337; 1305; 1257; 1167; 1125; 1074; 1016; 740; 694

4.4.8 2-methoxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM9

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁N₃O₂

Molekulová hmotnost: 229,24

log *P*: 0,75

Clog *P*: 1,33779

R_f: 0,115

Teplota tání: 100,3-102,4 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 458,46 mg
- praktický: 52,1 mg (11 %)

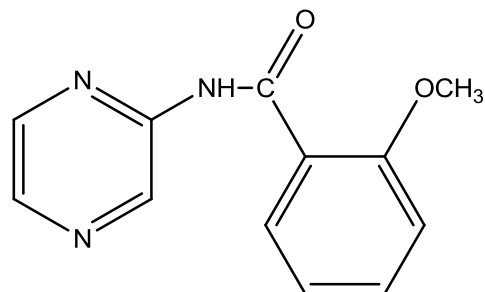
Elementární analýza:

- výpočet: C 62,87 %; H 4,84 %; N 18,33 %
- nalezeno: C 62,82 %; H 4,8 %; N 17,91 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.37 (bs, 1H, NH), 9.74 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.33 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5'), 8.30 – 8.25 (m, 2H. H6', H6), 7.56 – 7.50 (m, 1H, H4), 7.16 – 7.11 (m, 1H, H5), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H3), 4.08 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 163.36, 157.52, 148.67, 142.09, 139.96, 137.67, 134.12, 132.60, 121.63, 120.49, 111.58, 56.22.

IČ spektrum: 3335; 3016; 2955; 1673 (C=O, CONH); 1533; 1483; 1414; 1297; 1234; 1016; 844; 745; 685; 669



4.4.9 4-methyl-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM10

Sumární vzorec: C₁₂H₁₁N₃O

Molekulová hmotnost: 213,24

log *P*: 1,37

Clog *P*: 1,8128

R_f: 0,23

Teplota tání: 163,3-166,0 °C (dle lit. 165 °C [69])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 426,48 mg
- praktický: 122,1 mg (29 %)

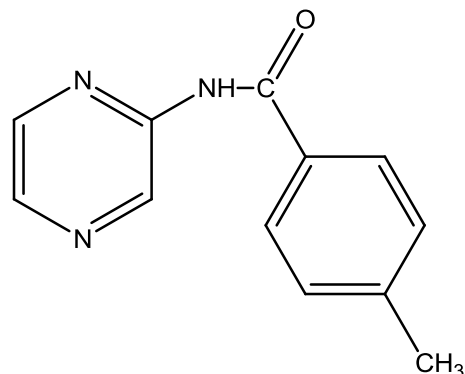
Elementární analýza:

- výpočet: : C 67,59 %; H 5,20 %; N 19,71 %
- nalezeno: C 67,37 %; H 5,1 %; N 19,59 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.71 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H3'), 8.66 (bs, 1H, NH), 8.35 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.23 (dd, *J* = 2.5, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H2, H6), 7.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H3, H5), 2.43 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.39, 148.40, 143.42, 141.97, 140.15, 137.23, 130.47, 129.59, 127.37, 21.54.

IČ analýza: 3245; 3109; 3063; 1676 (C=O, CONH); 1529; 1508; 1412; 1298; 1259; 1186; 1057; 1012; 847; 723; 685



4.4.10 2-chlor-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM11

Sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O

Molekulová hmotnost: 233,66

log *P*: 1,44

Clog *P*: 1,2215

R_f: 0,213

Teplota tání: 128,2-129,7 °C

(dle lit. 136,0-138,0 °C [69])

Výtěžek reakce:

- teoretický: 467,3 mg
- praktický: 72,4 mg (15 %)

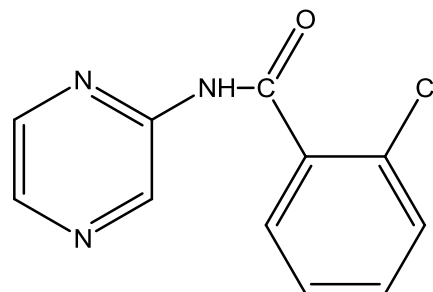
Elementární analýza:

- výpočet: C 56,55 %; H 3,45 %; N 17,98 %
- nalezeno: C 56,86 %; H 3,45 %; N 17,51 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.68 (s, 1H, H3'), 9.07 (bs, 1H, NH), 8.34 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.05 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.78 – 7.74 (m, 1H, ArH), 7.47 – 7.45 (m, 2H, ArH), 7.42 – 7.37 (m, 1H, ArH).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 164.65, 147.93, 141.91, 140.62, 137.29, 134.06, 132.31, 130.93, 130.58, 130.28, 127.37.

IČ spektrum: 3306; 3198; 3100; 2971; 1695 (C=O, CONH); 1530; 1412; 1299; 1253; 1151; 1048; 1015; 852; 774; 721



4.4.11 3-(acetoxy)-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM13

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁N₃O₃

Molekulová hmotnost: 257,25

log *P*: 0,47

Clog *P*: 0,837795

R_f: 0,098

Teplota tání: 168,4-169,5 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 679,11 mg (příprava z 2,64 mmol aminopyrazinu)
- praktický: 406,9 mg (60 %)

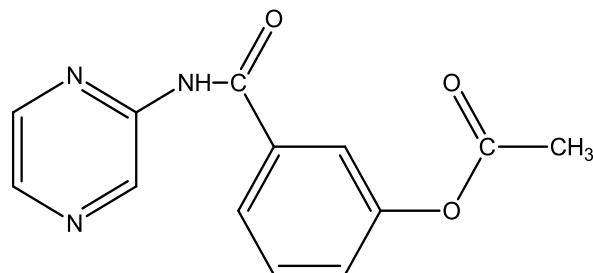
Elementární analýza:

- výpočet: C 60,7 %; H 4,31 %; N 16,33 %
- nalezeno: C 60,67 %; H 4,22 %; N 16,11 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.69 (s, 1H, H3'), 8.63 (s, 1H, NH), 8.38 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.25 (s, 1H, H6'), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.68 (s, 1H, H2), 7.52 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 7.33 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H4), 2.33 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 169.12, 164.41, 151.03, 148.11, 142.08, 140.52, 137.22, 134.90, 130.02, 125.98, 124.51, 121.01, 21.04.

IČ spektrum: 3244; 1768 (C=O, COOR); 1683 (C=O, CONH); 1541; 1421; 1304; 1271; 1215; 1194; 1016; 845; 716; 676



4.4.12 3-hydroxy-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM14

Sumární vzorec: C₁₁H₉N₃O₂

Molekulová hmotnost: 215,21

log *P*: 0,49

Clog *P*: 0,986

R_f: 0,066

Teplota tání: 192,2-193,7 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 167,32 mg
- praktický: 96,4 mg (58 %)
(připraveno hydrolýzou 201 mg látky
JZ-AM13)

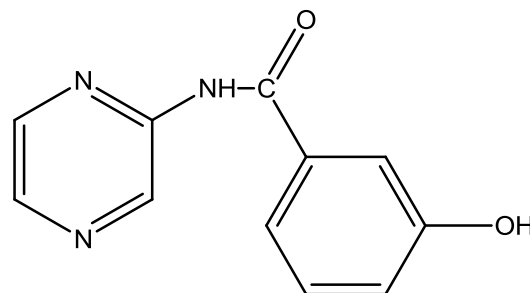
Elementární analýza:

- výpočet: C 61,39 %; H 4,22 %; N 19,53 %
- nalezeno: C 61,19 %; H 4,23 %; N 19,12 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.98 (bs, 1H, NH), 9.78 (bs, 1H, OH), 9.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.46 (dd, *J* = 2.6, 1.5 Hz, 1H, H6'), 8.40 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5'), 7.52 – 7.47 (m, 1H, ArH), 7.40 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, ArH), 7.32 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArH), 7.03 – 6.97 (m, 1H, ArH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.37, 157.56, 149.24, 142.75, 140.07, 137.72, 134.98, 129.65, 119.45, 118.87, 115.17.

IČ spektrum: 3343; 3158; 2851; 2705; 1679 (C=O, CONH); 1539; 1515; 1414; 1297; 1253; 1012; 819; 749; 691



4.4.13 4-ethyl-N-(pyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM15

Sumární vzorec: C₁₃H₁₃N₃O

Molekulová hmotnost: 227,26

log *P*: 1,79

Clog *P*: 2,3418

R_f: 0,353

Teplota tání: 121,2-122,3 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 454,54 mg
- praktický: 67,0 mg (15 %)

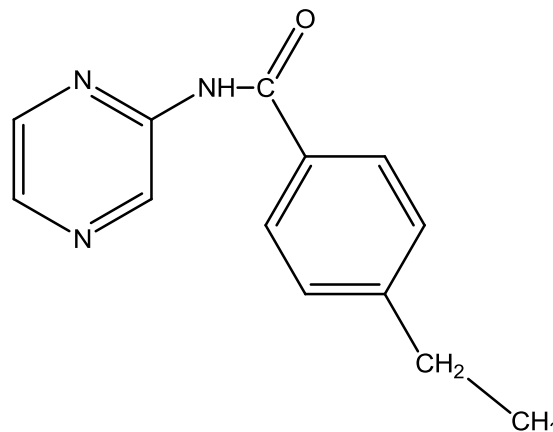
Elementární analýza:

- výpočet: C 68,70 %; H 5,77 %; N 18,49 %
- nalezeno: C 68,89 %; H 5,72 %; N 18,4 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.72 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3'), 8.67 (bs, 1H, NH), 8.35 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5'), 8.22 (dd, *J* = 2.6, 1.6 Hz, 1H, H6'), 7.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H2, H6), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H3, H5), 2.72 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.27 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 165.42, 149.58, 148.41, 141.98, 140.17, 137.25, 130.70, 128.41, 127.47, 28.82, 15.17.

IČ spektrum: 3239; 3107; 3049; 2959; 2933; 2875; 1685 (C=O, CONH); 1534; 1509; 1411; 1299; 1269; 1014; 840; 734; 695



4.4.14 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-methylbenzamid

Označení: JZ-AM17

Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O

Molekulová hmotnost: 247,68

log *P*: 2,27

Clog *P*: 2,56882

R_f: 0,833

Teplota tání: 169,1-170,0 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 495,36 mg
- praktický: 146,1 mg (29 %)

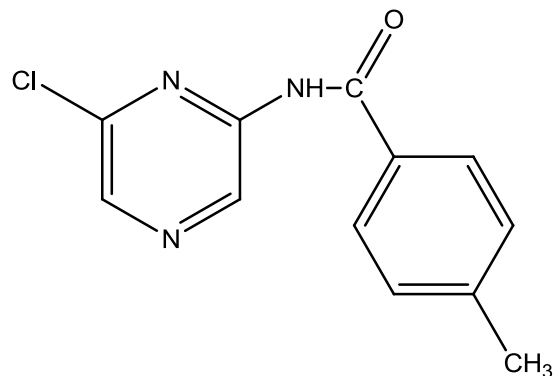
Elementární analýza:

- výpočet: C 58,19 %; H 4,07 %; N 16,97 %
- nalezeno: C 57,89 %; H 3,99 %; N 16,53 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.32 (bs, 1H, NH), 9.41 (s, 1H, H3'), 8.51 (s, 1H, H5'), 7.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H2, H6), 7.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H3, H5), 2.38 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.19, 148.73, 145.55, 142.95, 138.48, 135.29, 130.27, 129.16, 128.53, 21.24.

IČ spektrum: 3205; 3063; 1684 (C=O, CONH); 1541; 1398; 1293; 1271; 1159; 1106; 1008; 831; 736; 689



4.4.15 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-ethylbenzamid

Označení: JZ-AM18

Sumární vzorec: C₁₃H₁₂ClN₃O

Molekulová hmotnost: 261,71

log *P*: 2,69

Clog *P*: 3,09782

R_f: 0,87

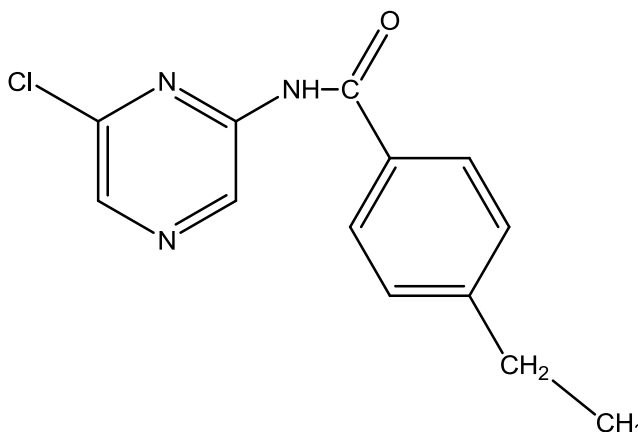
Teplota tání: 142,5-143,3 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 523,42 mg
- praktický: 136,0 mg (26 %)

Elementární analýza:

- výpočet: C 59,66 %; H 4,62 %; N 16,06 %
- nalezeno: C 59,22 %; H 4,49 %; N 15,74 %



¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.33 (bs, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, H3'), 8.52 (s, 1H, H5'), 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H2, H6), 7.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3, H5), 2.69 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.21, 149.04, 148.73, 145.55, 138.50, 135.29, 130.53, 128.63, 128.00, 28.27, 15.36.

IČ spektrum: 3203; 3063; 2969; 2882; 1682 (C=O, CONH); 1545; 1398; 1293; 1271; 1152; 1008; 845; 726

4.4.16 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)benzamid

Označení: JZ-AM20

Sumární vzorec: C₁₁H₈ClN₃O

Molekulová hmotnost: 233,66

log *P*: 1,78

Clog *P*: 2,06982

R_f: 0,796

Teplota tání: 152,8-153,6 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 466,08 mg
- praktický: 131,9 mg (28 %)

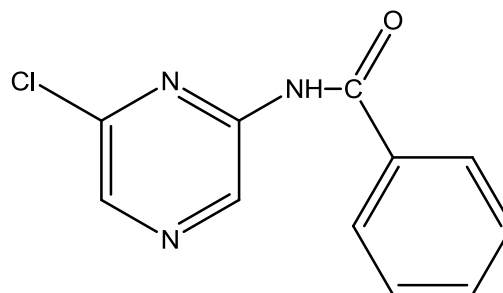
Elementární analýza:

- výpočet: C 56,55 %; H 3,45 %; N 17,98 %
- nalezeno: C 56,59 %; H 3,42 %; N 17,85 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.41 (bs, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, H3'), 8.53 (s, 1H, H5'), 8.07 – 8.03 (m, 2H, H2, H6), 7.66 – 7.60 (m, 1H, H4), 7.53 (m, 2H, H3, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.39, 148.65, 145.58, 138.64, 135.30, 133.12, 132.70, 128.61, 128.48.

IČ spektrum: 3209; 3066; 1686 (C=O, CONH); 1542; 1398; 1292; 1267; 1164; 1008; 882



4.4.17 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-4-chlorbenzamid

Označení: JZ-AM21

Sumární vzorec: C₁₁H₇Cl₂N₃O

Molekulová hmotnost: 268,10

log *P*: 2,34

Clog *P*: 2,79147

R_f: 0,852

Teplota tání: 193,8-194,7 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 536,2 mg
- praktický: 190,6 mg (36 %)

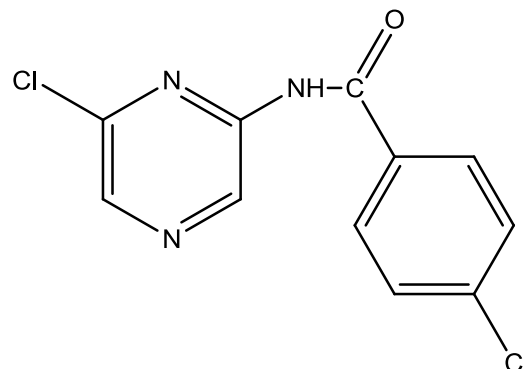
Elementární analýza:

- výpočet: C 49,28 %; H 2,63 %; N 15,67 %
- nalezeno: C 49,41 %; H 2,54 %; N 15,56 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.50 (s, 1H, NH), 9.40 (s, 1H, H3'), 8.54 (s, 1H, H5'), 8.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H2, H6), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H3, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.40, 148.50, 145.58, 138.79, 137.60, 135.27, 131.92, 130.43, 128.70.

IČ spektrum: 3196; 3065; 1687 (C=O, CONH); 1546; 1401; 1292; 1268; 1167; 1103; 1009; 842; 750; 682



4.4.18 *N*-(6-chloropyrazin-2-yl)-4-methoxybenzamid

Označení: JZ-AM22

Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O₂

Molekulová hmotnost: 263,68

log *P*: 1,66

Clog *P*: 2,15407

R_f: 0,685

Teplota tání: 196,9-198,8 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 527,36 mg
- praktický: 41,3 mg (8 %)

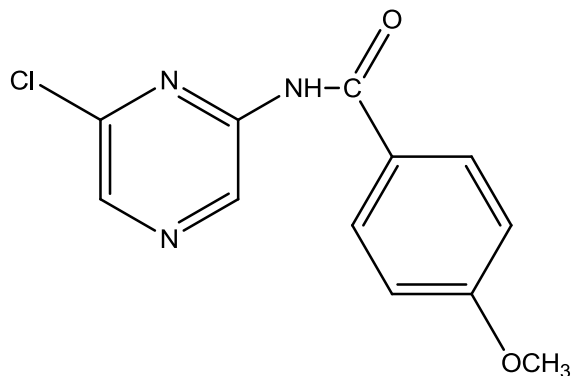
Elementární analýza:

- výpočet: C 54,66 %; H 3,82 %; N 15,94 %
- nalezeno: C 54,83 %; H 3,6 %; N 15,79 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.25 (bs, 1H, NH), 9.41 (s, 1H, H3'), 8.51 (s, 1H, H5'), 8.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H2, H6), 7.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H3, H5), 3.85 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.64, 162.85, 148.86, 145.52, 138.30, 135.29, 130.60, 125.08, 113.90, 55.69.

IČ spektrum: 3065; 2922; 2843; 1679 (C=O, CONH); 1550; 1509; 1416; 1399; 1260; 1187; 1164; 1008; 838; 738; 694



4.4.19 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-2-methoxybenzamid

Označení: JZ-AM23

Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O₂

Molekulová hmotnost: 263,68

log *P*: 1,66

Clog *P*: 2,08407

R_f: 0,537

Teplota tání: 149,1-150,7 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 527,36 mg
- praktický: 105,8 mg (20 %)

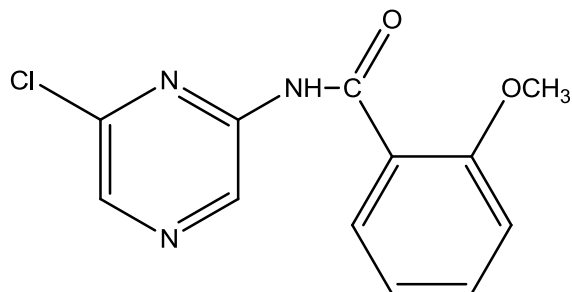
Elementární analýza:

- výpočet: C 54,66 %; H 3,82 %; N 15,94 %
- nalezeno: C 54,28 %; H 3,64 %; N 15,61 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.86 (bs, 1H, NH), 9.44 (s, 1H, H3'), 8.53 (s, 1H, H5'), 7.78 (dd, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H, H6), 7.62 – 7.54 (m, 1H, H4), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H3), 7.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H5), 3.95 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.88, 157.23, 147.92, 145.69, 138.82, 134.50, 133.69, 130.57, 122.32, 120.91, 112.50, 56.39.

IČ spektrum: 3320; 3071; 2951; 1676 (C=O, CONH); 1526; 1483; 1395; 1282; 1152; 1012; 1001; 756; 673



4.4.20 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid

Označení: JZ-AM24

Sumární vzorec: C₁₂H₇ClF₃N₃O

Molekulová hmotnost: 301,65

log *P*: 2,7

Clog *P*: 2,97553

R_f: 0,722

Teplota tání: 124,2-125,0 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 603,3 mg
- praktický: 280,1 mg (46 %)

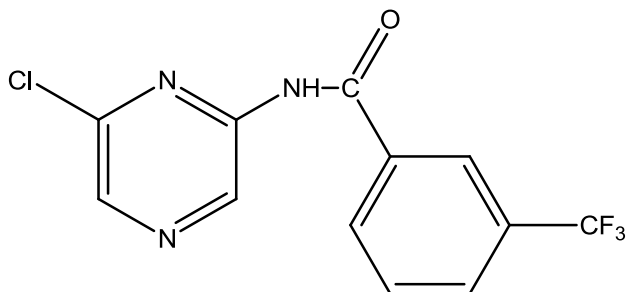
Elementární analýza:

- výpočet: C 47,78 %; H 2,34 %; N 13,93 %
- nalezeno: C 47,55 %; H 2,01 %; N 13,87 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.70 (bs, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, H3'), 8.55 (s, 1H, H5'), 8.42 (bs, 1H, H2), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H4), 7.77 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H5).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.05, 148.42, 145.61, 138.96, 135.25, 134.08, 132.59, 129.92, 129.35 (q, *J* = 32.3 Hz), 129.14 (q, *J* = 3.8 Hz), 125.22 (q, *J* = 3.8 Hz), 124.04 (q, *J* = 272.6 Hz).

IČ spektrum: 3303; 3040; 1655 (C=O, CONH); 1537; 1400; 1330; 1256; 1157; 1118; 1076; 1008; 826; 702; 677



4.4.21 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)- 2-chlorbenzamid

Označení: JZ-AM25

Sumární vzorec: C₁₁H₇Cl₂N₃O

Molekulová hmotnost: 268,10

log *P*: 2,34

Clog *P*: 1,96147

R_f: 0,611

Teplota tání: 182,4-183,4 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 536,2 mg
- praktický: 125,7 mg (23 %)

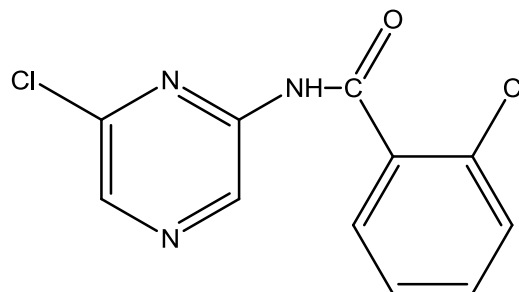
Elementární analýza:

- výpočet: C 49,28 %; H 2,63 %; N 15,67 %
- nalezeno: C 49,1 %; H 2,49 %; N 15,37 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.67 (s, 1H, NH), 9.40 (s, 1H, H3'), 8.56 (s, 1H, H5'), 7.62 (dd, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 1H, ArH), 7.59 – 7.50 (m, 2H, ArH), 7.49 – 7.42 (m, 1H, ArH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.07, 147.98, 145.76, 139.14, 135.46, 134.59, 131.88, 130.17, 129.84, 129.37, 127.32.

IČ spektrum: 3145; 3008; 2928; 1699 (C=O, CONH); 1537; 1417; 1401; 1287; 1152; 1124; 1005; 873; 745



4.4.22 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-methoxybenzamid

Označení: JZ-AM26

Sumární vzorec: C₁₂H₁₀ClN₃O₂

Molekulová hmotnost: 263,68

log *P*: 1,66

Clog *P*: 2,15407

R_f: 0,611

Teplota tání: 131,6-132,7 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 527,36 mg
- praktický: 141,9 mg (27 %)

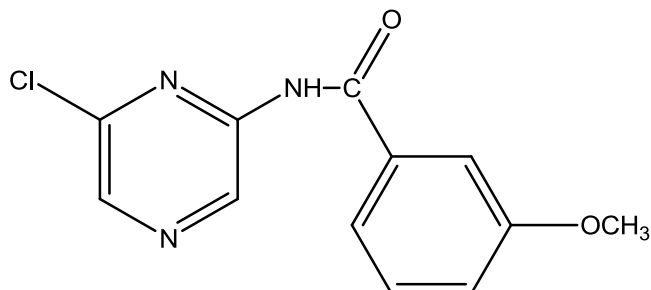
Elementární analýza:

- výpočet: C 54,66 %; H 3,82 %; N 15,94 %
- nalezeno: C 54,36 %; H 3,72 %; N 15,7 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 11.41 (s, 1H, NH), 9.42 (s, 1H, H3'), 8.53 (s, 1H, H5'), 7.67 – 7.58 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.18 (dd, J = 8.2, 2.5 Hz, 1H, ArH), 3.84 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 166.07, 159.31, 148.62, 145.57, 138.67, 135.33, 134.41, 129.76, 120.80, 119.03, 113.09, 55.56.

IČ spektrum: 3228; 3072; 2947; 2836; 1686 (C=O, CONH); 1541; 1488; 1415; 1398; 1283; 1160; 1047; 1007; 733; 704; 680



4.4.23 *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-chlorbenzamid

Označení: JZ-AM27

Sumární vzorec: C₁₁H₇Cl₂N₃O

Molekulová hmotnost: 268,10

log *P*: 2,34

Clog *P*: 2,79147

R_f: 0,722

Teplota tání: 131,6-132,7 °C

Výtěžek reakce:

- teoretický: 536,2 mg
- praktický: 171,1 mg (32 %)

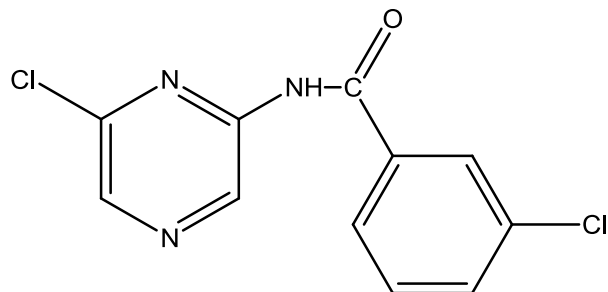
Elementární analýza:

- výpočet: C 49,28 %; H 2,63 %; N 15,67 %
- nalezeno: C 49,45 %; H 2,47 %; N 15,63 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, 1H, NH), 9.40 (s, 1H, H3'), 8.55 (s, 1H, H5'), 8.10 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H2), 8.02 – 7.96 (m, 1H, H6), 7.71 – 7.68 (m, 1H, ArH), 7.56 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.05, 148.40, 145.61, 138.91, 135.26, 135.13, 133.43, 132.45, 130.57, 128.29, 127.20.

IČ spektrum: 3202; 3070; 1691 (C=O, CONH); 1542; 1415; 1397; 1296; 1256; 1166; 1009; 775; 732; 690



4.5 Výsledky biologického testování

4.5.1 Antifungální aktivita

Testování látek na antifungální aktivitu probíhalo na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Testované kmeny jsou uvedeny v Tabulce č.2.

Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Testování probíhalo mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách (200 μ l media + 10 μ l suspenze inokula), při teplotě 35 °C, pH 7,0 v médiu RPMI 1640 s glutaminem. Inkubace probíhala staticky, ve tmě, v humidní atmosféře po dobu 24 – 48 hodin (u TM 48 – 72 h). Hustota inokulační suspenze byla 5x10³ CFU/ml. Jako standard bylo použito antimykotikum nystatin (NYS). Odečítání probíhalo vizuálně a výsledky byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je charakterizována jako minimální koncentrace látky, která inhibuje růst mikroorganismu.

Produkty JZ-AM18, JZ-AM20, JZ-AM21, JZ-AM22, JZ-AM24 a JZ-AM26 nemohly být otestovány kvůli vysrážení v testovacím médiu.

Testované látky nevykazovaly významnou aktivitu (viz. Tabulka č. 3 a 4)

Tabulka č. 2: Testované kmeny hub

| Testované kmeny (kód, číslo) | |
|---|--|
| CA1 – <i>Candida albicans</i> ATCC 44859 | TA – <i>Trichosporon asahii</i> 1188 |
| CT – <i>Candida tropicalis</i> 156 | AF – <i>Aspergillus fumigatus</i> 231 |
| CK2 – <i>Candida krusei</i> E28 | LC – <i>Lichtheimia corymbifera</i> 272 |
| CG – <i>Candida glabrata</i> 20/l | TM – <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 |

Tabulka č. 3: Výsledky testů antifungální aktivity

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | | |
|---------------|------|--|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|
| | | JZ-AM2 | JZ-AM3 | JZ-AM4 | JZ-AM5 | JZ-AM6 | JZ-AM7 | JZ-AM8 | JZ-AM9 |
| CA | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| CT | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| CK | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| CG | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| TA | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| AF | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| LC | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| TM | 24 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | 500 | >125 | >500 |
| | 48 h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | 500 | >125 | >500 |

Tabulka č. 4: Výsledky testů antifungální aktivity (pokračování)

| KMEN (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | | |
|------------|------|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | JZ-AM 10 | JZ-AM 11 | JZ-AM 13 | JZ-AM 14 | JZ-AM 15 | JZ-AM 23 | JZ-AM 25 | JZ-AM 27 |
| CA | 24 h | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | 500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| CT | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| CK | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| CG | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| TA | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| AF | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| AC | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| TM | 24 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |
| | 48 h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >125 |

4.5.2 Antibakteriální aktivita

Aktivita proti bakteriím uvedených v Tabulce č. 5 byla též prováděna na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Testované bakterie byly suspendovány v 0,85% roztoku NaCl. Buněčná hustota inokula byla upravena, čímž vznikla suspenze hustoty ekvivalentní 0,5 Mc Farlandovy stupnice ($1,5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovou řadou. Testování probíhalo mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách

(200µl media + 10µl suspenze inokula). Médiem byl Mueller-Hintonův bujon (MHB) o pH 7,4. Inkubace probíhala 24–48 hodin při teplotě 35°C, ve tmě, staticky a v humidní atmosféře. Odečítalo se vizuálně. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 6 a 7 a byly vyjádřeny jako minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je charakterizována jako minimální koncentrace látky, která inhibuje růst mikroorganismu. Látky neuvedené v tabulce se vysrážely v médiu nemohly být tedy relevantně otestovány.

JZ-AM8 vykazala mírnou aktivitu vůči *S. epidermidis* s MIC = 62,5 µmol.l⁻¹.

Tabulka č. 5: Testované kmeny bakterií

| Testované kmeny (kód, číslo) | |
|---|--|
| SA <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08 | EC <i>Escherichia coli</i> CCM4517 |
| MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 methicilin rezistentní | KP <i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08 |
| SE <i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08 | KP-E <i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL pozitivní |
| EF <i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08 | PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961 |

Tabulka č. 6: Výsledky antibakteriálního testování

| Kmen (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC (µmol.l ⁻¹) | | | | | | | |
|-------------|------|---|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|---------|
| | | JZ-AM2 | JZ-AM3 | JZ-AM4 | JZ-AM5 | JZ-AM6 | JZ-AM7 | JZ-AM8 | JZ-AM10 |
| SA | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| MRSA | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| SE | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | 62,5 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | 62,5 | >500 |
| EF | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| EC | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| KP | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| KP-E | 24h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 48h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| PA | 72h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |
| | 120h | >125 | >500 | >125 | >500 | >500 | >500 | >125 | >500 |

Tabulka č. 7: Výsledky antibakteriálního testování (pokračování)

| Kmen (kód) | | TESTOVANÁ LÁTKA (kód) – MIC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) | | | | | | | |
|-------------|------|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | JZ-AM10 | JZ-AM11 | JZ-AM13 | JZ-AM14 | JZ-AM15 | JZ-AM23 | JZ-AM25 | JZ-AM27 |
| SA | 24h | >500 | 250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | 250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| MRSA | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| SE | 24h | 500 | 500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | 500 | 500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| EF | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | 500 | >500 | >500 | >500 |
| EC | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| KP | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| KP-E | 24h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 48h | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| PA | 72h | >500 | 250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |
| | 120h | >500 | 250 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |

4.5.3 Antimykobakteriální aktivita

Všechny látky byly testovány in vitro na účinnost proti *M. tuberculosis* H37RV, *M. kansasii* 235/80, *M. avium* 80/72 a *M. smegmatis* CCM4622. Kmeny bakterií byly dodány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Praha.

Testování kmenů MT, MK a MA probíhalo ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Růstovým médiem byl Middlebrook 7H9 obohacený o růstový doplněk OADC (kyselina olejová, dextrosa, katalasa), obojí od firmy Sigma Aldrich, pH média mělo hodnotu 6,6. Jako pozitivní kontrola (inhibice růstu) byl použit isoniazid. Negativní kontrola (kontrola růstu mykobakterií) byla složená z živné půdy a dimethylsulfoxidu. Zkoušené látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním tak, aby finální koncentrace testovaných látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 100 – 50 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po pěti dnech inkubace se přidala látka Almar Blue a odečetly se výsledky. Minimální inhibiční koncentrace (MIC $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) představovala nejnižší koncentraci látky, která zabránila změně barvy z modré na růžovou.

Kmen MS byl testován v laboratoři na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Mgr. Ondřejem Jandourkem. Zkoušené látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním tak, aby konečné koncentrace v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,625 - 7,81 a 3,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Standardy představovaly ciprofloxacin a rifampicin, u kterých byly finální koncentrace 12,5 - 6,25 - 3,125 - 1,56 - 0,78 - 0,39 - 0,195 a 0,098 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Destičky byly uzavřeny polyesterovou folií a inkubovány ve tmě bez třepání při 37 °C. Po 48 hodinách se přidal roztok Alamar blue s přídavkem polysorbátu 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) představující nejnižší koncentraci látky, která zabránila změně barvy z modré na růžovou.

Tabulka č. 8: Antimykobakteriální aktivita připravených sloučenin vyjádřená jako MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v porovnání se standardy. Sloučeniny seřazeny dle charakteru substituentu R²

| kód | R ¹ | R ² | <i>M. tbc</i> | <i>M. kansasii</i> | <i>M. avium</i> | <i>M. smeg</i> |
|---------------------|----------------|--------------------|---------------|--------------------|-----------------|----------------|
| JZ-OV6 ^a | H | H | 100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM7 | H | 2-OH | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM13 | H | 3-OAc | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM14 | H | 3-OH | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM6 | H | 4-OAc | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM9 | H | 2-OCH ₃ | >100 | 100 | >100 | 125 |
| JZ-AM5 | H | 3-OCH ₃ | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM3 | H | 4-OCH ₃ | 25 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM10 | H | 4-CH ₃ | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM15 | H | 4-Et | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM11 | H | 2-Cl | >100 | >100 | >100 | 250 |
| JZ-AM4 | H | 3-Cl | 50 | 50 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-OV5 ^a | H | 4-Cl | 50 | 50 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM2 | H | 4-Cl (diacyl) | 50 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM8 | H | 3-CF ₃ | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM20 | 6-Cl | H | >100* | >100* | >100* | ≥ 500* |
| JZ-AM23 | 6-Cl | 2-OCH ₃ | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM26 | 6-Cl | 3-OCH ₃ | 50* | 100* | 100* | ≥ 500* |
| JZ-AM22 | 6-Cl | 4-OCH ₃ | >100 | >100 | >100 | ≥ 500* |
| JZ-AM17 | 6-Cl | 4-CH ₃ | >100* | >100* | >100* | ≥ 500* |
| JZ-AM18 | 6-Cl | 4-Et | >100* | >100* | >100* | ≥ 500* |
| JZ-AM25 | 6-Cl | 2-Cl | >100 | >100 | >100 | ≥ 500 |
| JZ-AM27 | 6-Cl | 3-Cl | >100* | >100* | >100* | ≥ 500* |
| JZ-AM21 | 6-Cl | 4-Cl | >100* | >100* | >100* | ≥ 500* |
| JZ-AM24 | 6-Cl | 3-CF ₃ | 25 | 25 | 50 | 125 |
| INH | - | - | 0,1–0,2 | 6,25–12,5 | 6,25–12,5 | 15,625 |
| RFM | - | - | - | - | - | 1,56 |
| CPX | - | - | - | - | - | 0,195 |
| PZA (pH 5,5) | - | - | 6,25–25 [58] | 500 [57] | neúčinný [60] | >2000 [59] |
| PZA (pH 6-7) | - | - | 125[58] | >500 | neúčinný [60] | - |

INH - isoniazid; RFM - rifampicin; CPX - ciprofloxacin; PZA - pyrazinamid

*vysráženo v médiu

^a Sloučeniny připraveny Ondřejem Valáškem. Analytická data budou publikována v jeho diplomové práci Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva IV, Hradec Králové, 2016. Antimykobakteriální aktivita těchto látek je zde uvedena pro úplnost.

5. DISKUZE

Výchozími látkami mých produktů byl 2-aminopyrazin nebo 2-amino-6-chlorpyrazin, ke kterým byl postupně přidán substituovaný benzoylchlorid. Samotná příprava probíhala za mírných podmínek přibližně 2 hodiny. Reakce probíhala mezi elektrondeficientním karbonylovým uhlíkovým atomem benzoylchloridu a primární aminoskupinou vázanou na pyrazin (6-chlorpyrazin) za uvolnění HCl. Principem syntézy byla nukleofilní substituce.

Některé produkty nebyly publikovány, z důvodu malých výtěžků nebo nedostatečné čistoty látky. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 8 % - 67 %. Průměrná hodnota činila 28,17 %. Ztráty byly způsobeny nejspíše čistícími procesy produktů (adsorpce na silikagel, chromatografické čištění, popřípadě rekrystalizace). Kvůli nízkým výtěžkům jsme také vynechali vytřepání reakční směsi mezi organickou fází a vodu (případně roztok NaHCO₃), které se nám jako čistící metoda neosvědčila a navíc přispívala ke snížení výtěžku.

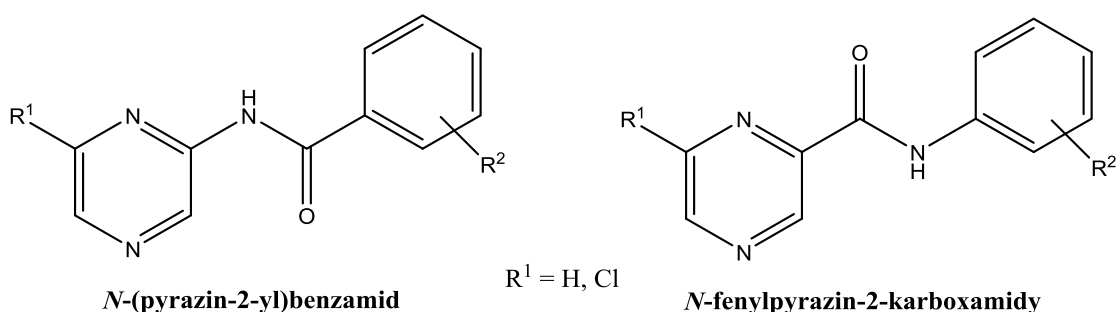
Při přípravě látky JZ-AM2 (R² = 4-Cl) vznikl diacylovaný produkt, původně zamýšlený monoacylovaný produkt nebyl vůbec izolován. Obecně platí, že diacylované produkty mohou vznikat při užití silného acylačního činidla (acylchlorid), při nadbytku acylačního činidla nad aminem, při zahřátí reakční směsi a při užití silné baze. Reakční směs jsme během přípravy chladili, ale je možné, že došlo k jejímu přehřívání. Abychom předešli vzniku diacylovaných derivátů, používali jsme jako bázi pyridin namísto triethylaminu, který díky své vyšší bazicitě podporuje vznik diacylovaných produktů [64].

Při přípravě látky JZ-AM7 proběhla spontánní hydrolýza esterové vazby za vzniku –OH skupiny. Tento děj můžeme vysvětlit kyselým charakterem silikagelu, který podporuje štěpení esterů [65], a se kterým látka přišla do styku při preparativní chromatografii. Eventuálně mohla tato hydrolýza nastat v průběhu rekrystalizace ze směsi ethanol/voda, která u této látky byla prováděna.

Ověření předpokládané struktury se provádělo pomocí určení ^1H a ^{13}C NMR a IČ spekter a elementární analýzy. Také byla u každé látky provedena kontrola pomocí TLC a změřená teplota tání. Všechny produkty byly většinou bílé nebo nažloutlé barvy a měly pevné skupenství.

Důležité jsou také parametry charakterizující lipofilitu látek – $\log P$, $\text{Clog } P$, které byly vypočítány pomocí programu ChemDraw. Hodnoty $\log P$ se pohybovaly v rozmezí od 0,47 u látky JZ-AM7 do 3,84 u JZ-AM2. Tato hodnota se dala očekávat kvůli struktuře látky, která obsahuje diacylovaný zbytek.

Na základě již potvrzené antimykobakteriální aktivity *N*-fenyropyrazin-2-karboxamidů [56] (Obrázek č. 6) jsme chtěli ověřit, zda stejné aktivity dosáhneme obměnou spojovacího můstku mezi pyrazinovým a benzenovým jádrem. Tabulka 9 uvádí Srovnání antimykobakteriální aktivity (*M. tbc* H37Rv) připravených *N*-pyrazinylbenzamidů s analogickými *N*-fenyropyrazin-2-karboxamidy se stejnou substitucí.



Obrázek č. 6: Obecný vzorce *N*-(pyrazin-2-yl)benzamidů a *N*-fenyropyrazin-2-karboxamidů

Tabulka č. 9: Srovnání antimykobakteriální aktivity (*M. tbc* H37Rv) připravených *N*-pyrazinylbenzamidů s analogickými *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy

| R ¹ | R ² | <i>N</i> -pyrazinylbenzamid tj. amid kys. benzoové | | srovnání aktivity | <i>N</i> -fenylpyrazin-2-karboxamid tj. anilid kys. pyrazinové | | |
|----------------|--------------------|---|---|----------------------|---|---|------|
| | | Kód | MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | | Inhibice (%) při 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | Ref |
| H | 4-Cl | JZ-OV5 | 50 | >≈ | 4 | - | [61] |
| H | 3-Cl | JZ-AM4 | 50 | ≈ | 14 | - | [61] |
| H | 3-CF ₃ | JZ-AM8 | >100 | < | - | 6,25 | [62] |
| H | 4-CH ₃ | JZ-AM10 | >100 | < | 86 | - | [63] |
| H | 2-Cl | JZ-AM11 | >100 | < | - | 50 | [62] |
| Cl | 4-CH ₃ | JZ-AM17 | >100 | < | 71 | - | [61] |
| Cl | H | JZ-AM20 | >100 | < | 32 | - | [63] |
| Cl | 4-Cl | JZ-AM21 | >100 | < | 65 | - | [61] |
| Cl | 3-CF ₃ | JZ-AM24 | 25 | < | 77 | - | [61] |
| Cl | 2-Cl | JZ-AM25 | >100 | < | - | 100 | [62] |
| Cl | 3-OCH ₃ | JZ-AM26 | 50 | >≈ | 2 | - | [61] |
| Cl | 3-Cl | JZ-AM27 | >100 | < | 14 | - | [61] |

U látek JZ-AM2, JZ-AM3, JZ-AM4, JZ-OV5, JZ-AM24 a JZ-AM26 byla prokázána mírná až střední účinnost ($\text{MIC} = 25\text{--}50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) vůči testovaným mykobakteriálním kmenům, nejčastěji proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Látka JZ-AM24 ($\text{R}^1 = \text{Cl}$, $\text{R}^2 = \text{CF}_3$) vykazovala aktivitu proti *MT*, *MA*, *MK* i *MS* a měla tak nejširší spektrum účinku z testovaných látek. Tato sloučenina bude testována na *in vitro* cytotoxicitu na buněčné linii lidských hepatocytů HepG2. Anilid s odpovídající substitucí ($\text{R}^1 = \text{Cl}$, $\text{R}^2 = \text{CF}_3$) byl taktéž účinný proti *MT*. Vysokou antimykobakteriální aktivitu vykazují anilidy se stejnými substituenty jako JZ-AM10, JZ-AM17, JZ-AM21, ale ani u jedné z těchto látek se aktivita neprokázala.

Závěrem lze konstatovat, že záměna spojovacího můstku -CONH- ve struktuře antimykobakteriálně účinných anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny za můstek -NHCO- (za vzniku *N*-pyrazinylbenzamidů) vede obvykle ke snížení až ztrátě antimykobakteriální aktivity.

6. ZÁVĚR

Cílem mé práce bylo napsat rešerši o současném stavu tuberkulózy, její charakterizaci, symptomech a především současné léčbě. Tuto problematiku jsem popsala v teoretické části.

V praktické části jsem se zabývala syntézou derivátů pyrazinamidu jakožto nových potenciálních antituberkulotik. V laboratoři jsem připravila deriváty *N*-(pyrazin-2-yl)benzamidů a *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)benzamidů s různými substituenty na benzenovém jádře. Celkem bylo připraveno 23 finálních produktů, z toho 17 nových, v literatuře dosud nepopsaných sloučenin (dle CAS SciFinder ke dni 11. 5. 2016). Produkty JZ-AM3, JZ-AM6, JZ-AM7, JZ-AM8, JZ-AM10 a JZ-AM11 byly dříve popsány v literatuře, avšak jejich antimykobakteriální aktivita nebyla známa.

Připravené produkty byly charakterizovány teplotou tání, ^1H , ^{13}C NMR a IČ spektry a elementární analýzou. Pomocí programu ChemDraw jsem získala vzorce, parametry lipofility $\log P$ a $\text{Clog } P$ a teoretické hodnoty prvkového složení všech produktů.

Získané látky byly odeslány na biologické hodnocení ke zjištění antituberkulotické, antibakteriální a antifungální aktivity. Látky JZ-AM3 ($\text{MIC} = 109 \mu\text{mol.l}^{-1}$), JZ-AM4 ($214 \mu\text{mol.l}^{-1}$), JZ-AM12 ($134 \mu\text{mol.l}^{-1}$), JZ-AM24 ($82 \mu\text{mol.l}^{-1}$), JZ-AM26 ($89 \mu\text{mol.l}^{-1}$) byly mírně až středně účinné proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Po srovnání molárních MIC těchto látek s PZA bylo zjištěno, že nově připravené deriváty byly při pH 6,6 účinnější než PZA ($\text{MIC} = 1015 \mu\text{mol.l}^{-1}$), ale méně účinné než INH ($\text{MIC} = 0,7\text{--}1,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu vykazoval *N*-(6-chlorpyrazin-2-yl)-3-(trifluormethyl)benzamid (JZ-AM24), který byl účinný jak proti *M. tuberculosis* H37Rv ($\text{MIC} = 83 \mu\text{mol.l}^{-1}$), tak proti *M. kansasii* 235/80 ($\text{MIC} = 83 \mu\text{mol.l}^{-1}$), *M. avium* 80/72 ($\text{MIC} = 166 \mu\text{mol.l}^{-1}$) i *M. smegmatis* CCM4622 ($\text{MIC} = 414 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Antifungální aktivita nebyla prokázána u žádné z testovaných látek. Mírnou antibakteriální aktivitu vykazoval 3-(trifluormethyl)-*N*-(pyrazin-2-yl)benzamid (JZ-AM8), jež byl účinný proti *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 ($\text{MIC} = 62,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$).

Cílem mojí práce bylo ověřit, zda má obměna spojovacího můstku mezi pyrazinovým a benzenovým jádrem vliv na antimykobakteriální aktivitu. Lze konstatovat, že záměna spojovacího můstku -CONH- ve struktuře antimykobakteriálně účinných anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny za můstek -NHCO- (za vzniku *N*-pyrazinylbenzamidů) vedla obvykle ke snížení až ztrátě aktivity.

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Řešitel: Alžběta Mindlová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva V

Tato práce se zabývá problematikou tuberkulózy, jež je celosvětově po HIV druhou nejčastější příčinou úmrtí ze všech infekčních nemocí. K tomu přispívá i stále narůstající počet kmenů mykobakterií, které jsou rezistentní vůči běžným antituberkulotikům. Právě pro rozvoj multilékově-rezistentní tuberkulózy je potřeba vývoje nových léčiv pro terapii tohoto onemocnění.

Předlohou pro konečné sloučeniny byly již dříve připraveny anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny, které vykazovaly antituberkulotickou aktivitu. Cílem mé práce bylo ověřit účinnost *N*-(pyrazin-2-yl)benzamidů vzniklých myšlenou obměnou spojovacího můstku mezi pyrazinovým a benzenovým jádrem. V experimentální části práce je popsána syntéza 23 látek, jež vycházela z 2-aminopyrazinu či 2-amino-6-chlorpyrazinu a příslušně substituovaných benzoylchloridů. Všechny produkty byly popsány teplotou tání, ^1H , ^{13}C NMR a IČ spektry, elementární analýzou. Látky byly odeslány k biologickému hodnocení, kde se testovaly na antibakteriální, antifungální a antituberkulotickou aktivitu. Podrobné výsledky testování jsou popsány a diskutovány v závěru práce. Záměna spojovacího můstku -CONH- ve struktuře antimykobakteriálně účinných anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny za můstek -NHCO- (za vzniku *N*-(pyrazin-2-yl)benzamidů) vedla obvykle ke snížení až ztrátě antimykobakteriální aktivity.

8. ABSTRAKT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Author: Alžběta Mindlová

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

Title of diploma thesis: Pyrazine Derivatives as Potential Drugs V

This study deals with the issue of tuberculosis, which is a second leading cause of deaths after HIV from all infectious diseases worldwide. This is supported by an ever increasing number of mycobacteria, which is resistant to conventional antitubercotics. Because of grow of the multidrug-resistant tuberculosis, there is need for the development of new drugs in the therapy of this disease.

The design of final compounds was based on the previously prepared pyrazine-2-carboxylic acid, which exerted antitubercotic activity. The object of study was to verify the effectiveness of *N*-(pyrazine-2-yl)benzamides created by an imaginary variation of the connecting bridge between the pyrazine and benzene ring. In the experimental part of the work the synthesis of twenty three substances derived from 2-aminopyrazin or 6-chlor-2-aminopyrazin is described. All products have been described by melting point, ¹H, ¹³C NMR, IR spectroscopy and the elementary analysis. The substances were send for the biological evaluation, where were tested for antibacterial, antifungal and antimycobacterial activity. Detailed test results are described and discussed in the conclusion. The replace of the connecting bridge -CONH- for -NHCO- bridge in the structure of antimycobacterial effective pyrazine-2-carboxylic acid (to form of *N*-(pyrazin-2-yl)benzamids) led usually to reduce or loss of the antimycobacterial activity.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SERVUSOVÁ Barbora, VOBICKOVÁ J., PATEROVÁ P., KUBÍČEK V., KUNEŠ J., DOLEŽAL M. a ZITKO J., Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013, **23**, str. 3589–3591. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.021
- [2] MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J.; DVOŘÁČKOVÁ, J.; Patologie, 2. doplněné vydání, 2012, Grada Publishing a.s., str. 103 - 106 [ISBN 978-80-247-7770-2]
- [3] VERSCHOOR Jan, BAIRD M. S., GROOTEN J., Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Progress in Lipid Research*. 2012, **51**, str. 325–339. DOI: 10.1016/j.plipres.2012.05.002.
- [4] MACELA Aleš. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. str. 156 [ISBN 80-247-0664-4]
- [5] POVÝŠIL Ctibor a ŠTEINER I., *Obecná patologie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2011, str. 96 - 99 [ISBN 978-80-7262-773-8]
- [6] Fakta o screeningu na tuberkulózu. *Informační příručka pro odborné zdravotnické pracovníky*. SÚKL, 2013.
- [7] KARGES Wolfram a DAHOUK S., *Vnitřní lékařství: stručné repetitorium*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, str. 142 - 143 [ISBN 978-80-247-3108-7]
- [8] Přednáška: Mikroskopie v mikrobiologii & Mikrobiologická barvení, Jan Smíšek, 3. LF UK
- [9] Přednáška MUDr. Josefa Scharfena, CSc.(Faf, UK): Laboratorní diagnostika onemocnění vyvolaných mykobakteriemi a příbuznými mikroorganismy
- [10] MELTER Oto a MALMGREN A., *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2014, str. 57 [ISBN 978-80-246-2414-3]

- [11] KLENER Pavel. *Vnitřní lékařství*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2011, **2**, str. 385 - 386 [ISBN 978-80-7262-705-9]
- [12] TORTOLI Enrico, LAVINIA F. a SIMONETTI T., Early Detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC Cultures by Ligase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, **36**, str. 2791-2792. [ISSN 1098-660X]
- [13] PTÁKOVÁ Miluška. Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz. *Medicína pro praxi*. 2011; **8**, str. 466-468 [ISSN 1803-5310]
- [14] POTREPČIAKOVÁ Stanislava a SKŘIČKOVÁ J., Tuberkulóza. *Practicus*. 2008, str. 24-29 [ISSN 1213-8711]
- [15] SCHINDLER Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada), str. 110 [ISBN 978-80-247-3170-4]
- [16] BASSAM a MAYANK H., Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management. *InTech*, 2013. **18**, Str. 478 DOI: 10.5772/56396. [ISBN 978-953-51-1049-1]
- [17] WOUK Henry. *Tuberculosis*. Marshall Cavendish NY, 2010, **3**, str. 28 [ISBN 978-0-7614-4611-8.]
- [18] World Health Organization, Tuberculosis Key facts: dostupné z:
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> [citace 10.4.2016]
- [19] Lékaři bez hranic: Tuberkulóza: dostupné z: <http://www.lekari-bez-hranic.cz/cz/tuberkuloza?gclid=COHX09vn1soCFSUewwodkEAJNQ>
[cit. 14.3.2016]
- [20] GÖPFERTO VÁ Dana, PAZDIORA P. a DÁŇOVÁ J., *Epidemiologie infekčních nemocí*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, **2**, str. 157 [ISBN 80-246-0452-3]
- [21] HOMOLKA Jiří a VOTAVA V., *Tuberkulóza*. 4., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2012, str. 7 [ISBN 978-80-246-2070-1]

- [22] Tuberkulóza a respirační nemoci. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Zdravotnická statistika, 2014, str. 11 - 13 [ISBN 978-80-7472-144-1]
- [23] Nemocnice na Bulovce, Aktuality: dostupné z: <http://bulovka.cz/svetovy-den-tuberkulozy/> [cit.28.2.2016]
- [24] LÜLLMANN, Heinz, MOHR K. a HEIN L., *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Překlad Maxmilián Wenke. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, 2012, 556, str. 264 [ISBN 978-80-247-3908-3]
- [25] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, str. 319 [ISBN 978-80-247-1356-4.]
- [26] PANGE Paolo a SIMONDS A., *ERS Handbook of Respiratory medicine*. Hermes, 2013, str. 234 [ISBN 978-1-84984-040-8]
- [27] *Treatment of tuberculosis: guidelines*. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2010, str. 30 [ISBN 92-415-4783-9]
- [28] VILCHEZE, C., WEISBROD T. R., CHEN B., et al. Altered NADH/NAD Ratio Mediates Coresistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, **60**, str. 708-720 DOI: 10.1128/AAC.49.2.708-720.2005
- [29] SOTSUKA, Takayo. *Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients*. In vivo [online]. 2011, **25**, str. 803-812. [ISSN 0258851X]
- [30] SLÍVA Jiří a VOTAVA M., *Farmakologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2011. *Lékařské repetitorium*, str. 310 [ISBN 978-80-7387-500-8]
- [31] CHEN Jiezhong a RAYMOND K., *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006, **5**. DOI: 10.1186/1476-0711-5-3.

- [32] BARRY Clifton. *New horizons in the treatment of tuberculosis. Biochemical pharmacology*. 1997, **54**, str. 1165-1172. DOI: 10.1016/S0006-2952(97)00163-9. [ISSN 00062952]
- [33] LÜLLMANN Heinz, MOHR K. a WEHLING M., *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, str. 511, 521 - 526 [ISBN 80-247-0836-1]
- [34] SCHOLAR Eric a PRATT W. The Antimicrobial Drugs, Second Edition New York: Oxford University Press. *Clinical Infectious Diseases*. 2000, **32**. str. 521 DOI: 10.1086/318515
- [35] SAYAHI Halimah, PUGLIESE K. M., ZIMHONY O., JACOBS W. R., SHEKHTMAN A. a WELCH J. T., Analogs of the Antituberculous Agent Pyrazinamide Are Competitive Inhibitors of NADPH Binding to M. tuberculosis Fatty Acid Synthase I. *Chemistry & Biodiversity*. 2012, **9**, str. 2582–2596. DOI: 10.1002/cbdv.201200291
- [36] BARNES Peter, DAVIES P. a GORDON S.. *Clinical Tuberculosis 4th Edition*. 4. CRC Press, 2008, str. 213 - 214 [ISBN 9781444109641]
- [37] BOSHOFF H. I., MIZRAHI V. a BARRY C. E., Effects of Pyrazinamide on Fatty Acid Synthesis by Whole Mycobacterial Cells and Purified Fatty Acid Synthase I. *Journal of Bacteriology*. 2002, **184**, str. 2167-2172. DOI:10.1128/JB.184.8.2167-2172.2002
- [38] SAYAHI Halimah, ZIMHONY O., JACOBS W. R., SHEKHTMAN A. WELCH J. T., Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, **21**, str. 4804–4807. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.06.055
- [39] YANG Juanjuan, LIU Y., BI J., et al. Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Molecular Microbiology*. 2015, **95**, str. 791–803. DOI: 10.1111/mmi.1289

- [40] SHI Wanliang, CHEN J., FENG J, CUI P., ZHANG S., WENG X., ZHANG W. a ZHANG Y., Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*. 2014, **3**. DOI: 10.1038/emi.2014.61
- [41] DURAND Francois, JEBRAK G., PESSAYRE D., FOURNIER M. a BERNUAU J., Hepatotoxicity of Antitubercular Treatments. *Drug Safety*. 1996, **15**, str. 394-405. DOI: 10.2165/00002018-199615060-00004
- [42] ZHENG J., RUBIN E. J., BIFANI P., et al. Para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013, **288**, str. 23447-23456. DOI:10.1074/jbc.M113.475798.
- [43] DYER John R., CARTER J. H. a VAN WYK P. J., Catalytic hydrogenation of viomycin and capreomycin. *Journal fo Medicinal Chemistry*. 1971, **14**, str. 1120–112. DOI: 10.1021/jm00293a027
- [44] CHOI Joonhyeok, PARK S. a JEE J., Analogues of ethionamide, a drug used for multidrug-resistant tuberculosis, exhibit potent inhibition of tyrosinase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, **106**, str. 157–166. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.10.033.
- [45] LINCOVÁ Dagmar a FARGHALI H., *Základní a aplikovaná farmakologie*, 1. vyd. Praha: Galén, 2002, str. 453 [ISBN 80-7262-168-8]
- [46] KUMAR Bhavnesh. *Proteomic analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to kanamycin and amikacin*. *Journal of proteomics* [online]. 2013, **94**, str. 68-77. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.08.025.
- [47] ALÓS Juan-Ignacio. Quinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009, **27**, str. 290-297. DOI: 10.1016/j.eimc.2009.03.001

- [48] WOLFSON J. S, HOOPER D. C. *Fluoroquinolone antimicrobial agents*. Clinical Microbiology Reviews. 1989; **2**, str. 378-424
- [49] TAKIFF H. a GUERRERO E., Current Prospects for the Fluoroquinolones as First-Line Tuberculosis Therapy. *Antibacterial Agent and Chemotherapy*. 2011, **55**, str. 5421-5429. DOI: 10.1128/AAC.00695-11
- [50] BÁRTŮ Václava. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní medicína pro praxi*. 2007, str. 372-373 [ISSN 1803-5256]
- [51] WHO. *Introduction of bedaquiline for the treatment of multidrugresistant tuberculosis at country level*. Geneva: WHO, 2015. [ISBN 978 92 4 150857 5]
- [52] WHO. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva: WHO, 2015. [ISBN 978 92 4 156505 9]
- [53] HEYM B.; COLE, S. T.; *Multidrug resistance in Mycobacterium Tuberculosis*, International Journal of Antimicrobial Agents, 1997, **8**, str. 61-70, [ISSN 0924-8579]
- [54] HAWKRIDGE Anthony. Clinical studies of TB vaccines. *Human Vaccines*. 2009, **5**, str. 773-776. DOI: 10.4161/hv.5.11.9310.
- [55] ROY A., EISENHUT M., HARRIS R. J., et al Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014, **349**. DOI: 10.1136/bmj.g4643
- [56] SERVUSOVA B. Synthesis, Antimycobacterial Activity and In Vitro Cytotoxicity of 5-Chloro-N-phenylpyrazine-2carboxamides. *Molecules* [online].2013, **18**, str. 14807-1482 DOI: 10.3390/molecules181214807.
- [57] SUN Z. H. Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of Mycobacterium kansasii to the antituberculosis drug pyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999, **43**, str. 537-542 [ISSN 00664804]

- [58] SALFINGER M., Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [online]. 1988, **32**, str. 1002-1004 [ISSN 00664804]
- [59] GUO M., *Mycobacterium smegmatis* Has Two Pyrazinamidase Enzymes, PncA and PzaA. *Journal of bacteriology*. 2000, **182**, str. 3881-3884 DOI:10.1128/JB.182.13.3881-3884.2000
- [60] HEIFETS Leonid, ISEMAN M.D., CROWLE A.J. a LINDHOLM-LEVY P.I., Pyrazinamide Is Not Active *in vitro* against *Mycobacterium avium* Complex, *American Review of Respiratory Disease* 1986, **134**, str. 1287-1288 [ISSN 0003-0805]
- [61] DOLEZAL Martin. Pyrazinecarboxylic Acid Derivatives with Antimycobacterial Activity. *Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance* 2012, str. 233-262, DOI: 10.5772/2477
- [62] ZITKO Jan, SERVUSOVÁ-VAŇÁSKOVÁ B., PATEROVÁ P., NAVRÁTILOVÁ L., TREJTAR F., KUNEŠ K. a DOLEŽAL M., Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Papers*. 2016, **70**, str. 649–657. DOI: 10.1515/chempap-2015-0246.
- [63] DOLEZAL Martin, PALEK L., VINSOVA J., BUCHTA V., JAMPILEK J. a KRALOVA K., Substituted Pyrazinecarboxamides: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules*. 2006, **11**, str. 242-256. DOI: 10.3390/11040242
- [64] THEODOROU Vassiliki. Insights into the N,N-diacylation reaction of 2-aminopyrimidines and deactivated anilines: an alternative N-monoacylation reaction. *ARKIVOC* 2014, **39**, str. 11-23 [ISSN 15517004]

- [65] SHIBATA Katsue, KIYOURA T. a HAYASHI Y., Acid property and catalytic activity of silica gel treated with ammonium salts. *Journal of the Research Institute for Catalysis Hokkaido University*. The Research Institute for Catalysis Hokkaido University 1971. **19**, str. 29 [ISSN 0034-530X]
- [66] HACHIYA Sojiro, INAGAKI T., HASHIZUME D., MAKI S., NIWA H. a HIRANO T. . Synthesis and fluorescence properties of difluoro[amidopyrazinato-O,N]boron derivatives: a new boron-containing fluorophore. *Elsevier*. 2010, **51**, str. 1613–1615. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.01.072
- [67] KAKEMI. *Yakugaku Zasshi*. 1962, **56**, str. 1609 [ISSN 0031-6903]
- [68] VIGORITA M. G., GRASSO S., ZAPPALA M., OTTANA R., MONTFORTE M. T., BARBERA R. a TROVATO A., Aminopyrazinyl Derivatives. *ChemInform*. 1994, **25**. DOI: 10.1002/chin.199441151
- [69] SAMBAIAH, T. a K. K. REDDY. Synthesis of 2-Aryl-(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyrazines. *ChemInform*. 1992, **23**. DOI: 10.1002/chin.199240197