

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A
FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



DERIVÁTY KOMBINUJÍCÍ FRAGMENT PYRAZINAMIDU
A 4-AMINOSALICYLOVÉ KYSELINY JAKO
ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ SLOUČENINY

Diplomová práce

Petr Šlechta

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: MSc. Ghada Basem Bouz, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Prohlášení autora:

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

Petr Šlechta

V Hradci Králové, květen 2020

Poděkování

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

Děkuji i za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 547) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt C-C3/1572317).

Obsah

1	Seznam použitých zkratek.....	6
2	Cíl diplomové práce.....	9
3	Teoretická část.....	10
3.1	Rod <i>Mycobacterium</i>	10
3.2	Patofyziologie.....	12
3.3	Rezistence.....	13
3.4	Vakcinace.....	14
3.5	Léčba.....	15
3.5.1	Léčiva první linie.....	17
3.5.2	Léčiva 2.linie.....	24
3.5.3	Nová léčiva.....	31
3.6	Hybridizace při navrhování nových léčiv.....	34
3.7	Příklady hybridizace při navrhování nových antituberkulotik.....	36
3.8	Titulní sloučeniny.....	38
4	Experimentální část.....	39
4.1	Použité chemikálie, přístrojové vybavení a analytické metody.....	39
4.2	Syntéza 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a jejích jednotlivých substituovaných derivátů.....	41
4.3	Postup přípravy 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a jejích jednotlivých substituovaných derivátů.....	43
4.3.1	BBPS1.....	43
4.4	Výchozí látky a činidla použité při syntéze.....	45
4.4.1	Pyrazin-2-karboxylová kyselina.....	45
4.4.2	3,8a-Dihydroimidazo[1,2- <i>a</i>]pyrazin-2-karboxylová kyselina.....	45
4.4.3	Chinoxalin-2-karboxylová kyselina.....	45
4.4.4	3-Karbamoylpyrazin-2-karboxylová kyselina.....	45
4.4.5	3,5-Dichlorpyrazin-2-karboxylová kyselina.....	46
4.4.6	3-Oxo-3,4-dihydropyrazin-2-karboxylová kyselina.....	46
4.4.7	3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxylová kyselina.....	46
4.4.8	3-Methylpyrazin-2-karboxylová kyselina.....	46
4.4.9	6-Methylpyrazin-2-karboxylová kyselina.....	47
4.4.10	6-Chlorpyrazin-2-karboxylová kyselina.....	47
4.4.11	4-Amino-2-hydroxybenzoová kyselina (<i>p</i> -aminosalicylová kys.; PASA).....	47
4.4.12	1,1'-Karbonyldiimidazol (CDI).....	47

4.5	Nově připravené látky	48
4.5.1	2-Hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina.....	48
4.5.2	2-Hydroxy-4-(imidazo[1,2-a]pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina	49
4.5.3	2-Hydroxy-4-(chinoxalin-2-karboxamido)benzoová kyselina	50
4.5.4	4-(3-Karbamoylpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina .	51
4.5.5	4-(3,5-Dichlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina....	52
4.5.6	2-Hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina	53
4.5.7	2-Hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxamido)benzoová kyselina	54
4.5.8	2-Hydroxy-4-(3-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina	55
4.5.9	2-Hydroxy-4-(6-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina	56
4.5.10	4-(6-Chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina.....	57
4.6	Biologické testování látek	58
4.6.1	Antimykobakteriální aktivita.....	58
4.6.2	Antibakteriální aktivita.....	60
4.6.3	Antifungální aktivita	61
4.6.4	<i>In vitro</i> cytotoxicita.....	62
5	Výsledky a diskuse.....	63
6	Závěr.....	67
7	Abstrakt	68
8	Abstract.....	69
9	Přehled použité literatury.....	70

1 Seznam použitých zkratk

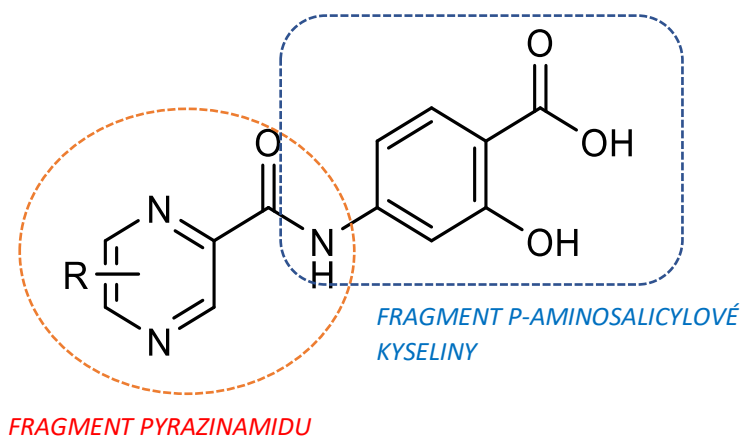
AIDS	(Acquired Immune Deficiency Syndrome) syndrom získaného selhání imunity
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacillus Calmette – Guérin
CDI	1,1'-Karbonyldiimidazol
CNS	centrální nervová soustava
CPX	ciprofloxacin
CYP	cytochrom P450
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DHFS	dihydrofolátsyntáza
DHPS	dihydropteroátsyntáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTS	(Directly Observed Treatment, Shortcourse) režim plně kontrolované léčebné péče
EtOAc	ethyl-acetát
FAS I	(Fatty Acid Synthase) syntáza mastných kyselin typu 1
FAS II	(Fatty Acid Synthase) syntáza mastných kyselin typu 2
FDA	(Food and Drug Administration) Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
fMet	<i>N</i> -formylmethionin
GIT	gastrointestinální (trakt)
Gps1	guanosin pentafofát syntáza
HCl	kyselina chlorovodíková
HepG2	lidské buněčné linie rakoviny jater
HIV	(Human Immunodeficiency Virus) virus lidské imunitní nedostatečnosti
IR	(infrared) infračervené
IL2	interleukin 2
INF γ	interferon gama
INH	isoniazid
InhA	enoyl-ACP reduktáza

KFCHFA	Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Log <i>P</i>	dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě <i>n</i> -oktanol/voda
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAO	monoaminoxidáza
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MDR	multidrug-resistance
MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis
MIC	minimální inhibiční koncentrace
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NAD	nikotinamid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetické resonance
PABA	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina (4-aminobenzoová kys.)
PanD	aspartát dekarboxyláza
PDB	Protein Data Bank
PASA	<i>p</i> -aminosalicylová kyselina (4-aminosalicylová kys.)
POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
PZáza	nikotinamidáza/ pyrazinamidáza
QAPRTáza	fosforibosyl transferáza chinolinové kyseliny
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RpsA	ribosomální protein S1
rRNA	ribosomální RNA
RR	rifampicin-resistance
TB	tuberkulóza
Th1	pomocné T-lymfocyty
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	(ultraviolet) ultrafialová

WHO (World Health Organization) Světová zdravotnická organizace
XDR extensive drug-resistance

2 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce je navrhnout a syntetizovat sérii hybridních sloučenin, které budou obsahovat ve své struktuře fragmenty dvou používaných antituberkulotik, a to pyrazinamidu jako antituberkulotika první linie a *p*-aminosalicylové kyseliny jako antituberkulotika druhé linie. Jednotlivé hybridní sloučeniny v sérii se budou navzájem lišit substitucí v oblasti pyrazinového jádra (viz. obecná struktura hybridních sloučenin).



Obecná struktura hybridních sloučenin

Připravené sloučeniny budou poté podrobeny testům na zjištění jejich antimikrobní aktivity proti šesti mykobakteriálním kmenům, osmi bakteriálním kmenům a osmi kmenům hub. Všechny použité kmeny budou klinicky významné. Dále budou sloučeniny podrobeny testům na zjištění jejich *in vitro* cytotoxicity proti buněčné linii HepG2 rakovinných buněk. Na základě získaných výsledků biologického testování se poté pokusíme popsat vliv obměn v oblasti pyrazinového jádra na biologickou aktivitu série hybridních sloučenin.

3 Teoretická část

Tuberkulóza (TB) je závažné infekční onemocnění způsobené bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* complex. Nejčastěji jsou postiženy plíce, v takovém případě hovoříme o tzv. pulmonální TB. Bakterie však mohou napadnout i jiné orgány, potom jde o tzv. extrapulmonální TB.

Tuberkulóza je vysoce nakažlivá. K přenosu onemocnění dochází nejčastěji vzduchem, kdy nakažená osoba s pulmonální infekcí při kašli uvolňuje do vzduchu infekční kapénky s mikroby. Podle výroční zprávy Světové zdravotnické organizace (World Health Organization, WHO) se jedná o chorobu, která je celosvětově mezi prvními deseti příčinami úmrtí. Pokud bude řeč jen o infekčních onemocněních, tak se jedná o nejčastější příčinu úmrtí způsobenou jedním infekčním agens, v žebříčku dokonce nad HIV/AIDS. Podle WHO zhruba 1,7 miliardy lidí, což odpovídá 23 % světové populace, trpí latentní formou TB. To znamená, že jsou po celý život v riziku rozvinutí aktivní formy. Celosvětově se odhaduje, že jen za rok 2018 onemocnělo aktivní TB 10 miliónů lidí (9,0-11,1 miliónů). Toto číslo je v posledních letech relativně stabilní. Rozložení nemocných mezi jednotlivými zeměmi se však extrémně liší. Nejvíce případů tuberkulózy se za rok 2018 objevilo v jihovýchodní Asii (44 %), v Africe (24 %) a v oblasti západního Pacifiku (18 %). Mnohem méně případů TB bylo ve východním Středomoří (8 %), v Americe (3 %) a v Evropě (3 %). Dvě třetiny z celosvětově nově vzniklých případů TB byly přiřazeny těmto osmi zemím: Indie (27 %), Čína (9 %), Indonésie (8 %), Filipínská republika (6 %), Pákistán (6 %), Nigérie (4 %), Bangladéš (4 %).¹

V roce 2017 se v České republice objevilo 505 případů TB, přičemž podíl nemocných narozených mimo Českou republiku činil 31 %. Pouze u 8 onemocnění byl nahlášen výskyt multidrug rezistentní TB (MDR-TB). Na TB zemřelo v roce 2017 25 lidí.²

3.1 Rod *Mycobacterium*

Tento rod obsahuje více než 50 druhů. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na obligátně patogenní a podmíněně patogenní druhy. K obligátně patogenním druhům patří například nechvalně známí původci tuberkulózy a lepry. Jedná se zejména o intracelulární parazity vyvolávající chronickou infekci. Rozvoj a závažnost infekce se odvíjí od množství patogenů a funkce imunitního systému. Podmíněně patogenní druhy jsou významnou složkou přírodních biotopů.³

Pro mykobakterie je charakteristické, že se jedná o acidorezistentní tyčinky různé délky od kokovitých až po vláknité formy. Acidorezistence znamená, že mykobakterie jsou obtížně barvitelné organickými barvivy a následně jsou odolné k odbarvení za použití kyselin. Acidorezistence je charakteristickou vlastností většiny mykobakterií, která se jen zřídka pozoruje u jiných mikrobů. Tato vlastnost je způsobena vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně. Dalším typickým znakem mykobakterií je vysoký obsah volných i vázaných lipidů. Jen pro představu můžeme uvést, že až 20% váhy bakteriální sušiny mykobakterií tvoří lipidy.³ Tukové látky zastupují zejména mastné kyseliny a odvozené estery, alkoholy nebo ketony. Mastné kyseliny se specifickou strukturou a počtem uhlíků od C₆₀ do C₉₀ se označují jako mykolové kyseliny.³ Mykolové kyseliny jsou nezbytnou složkou buněčné stěny mykobakterií. Díky nim je povrch bakterie hydrofobní, a proto je i velice obtížně zpracováván lysozomálními enzymy makrofágů. To je jeden z důvodů, proč mohou přežívat mykobakterie v buňce. Mykobakterie se vyznačují pomalým růstem a dlouhou generační dobou, která u *M. tuberculosis* činí 20 až 30 hodin, proto při jejich kultivaci musíme očekávat viditelný růst v makrokoloniích nejdříve zhruba po 14 dnech.³

Původcem lepry je *Mycobacterium leprae*. Vzhledem k tématu práce se budu na dalších stránkách zabývat pouze původci tuberkulózy. Za hlavního původce TB je označován komplex mykobakterií *Mycobacterium tuberculosis* complex. Jedná se o skupinu mykobakterií, které mají více než 90% DNA – DNA homologii a způsobují onemocnění TB u lidí nebo zvířat. Mezi zástupce *Mycobacterium tuberculosis* complex patří zejména *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* a *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG), *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*. *Mycobacterium tuberculosis* je hlavním zástupcem v komplexu a je neznámějším původcem lidské TB. *M. bovis* je zejména původcem TB skotu, ale může napadnout i jiná zvířata. Vzácněji může být i původcem nákazy člověka. *M. bovis* BCG (neboli *Bacillus Calmette – Guérin*) je záměrně vytvořený z původně virulentního kmene *M. bovis*. Jedná se o kmen zbavený virulence a používaný k přípravě vakcín proti TB.^{3,4,5}

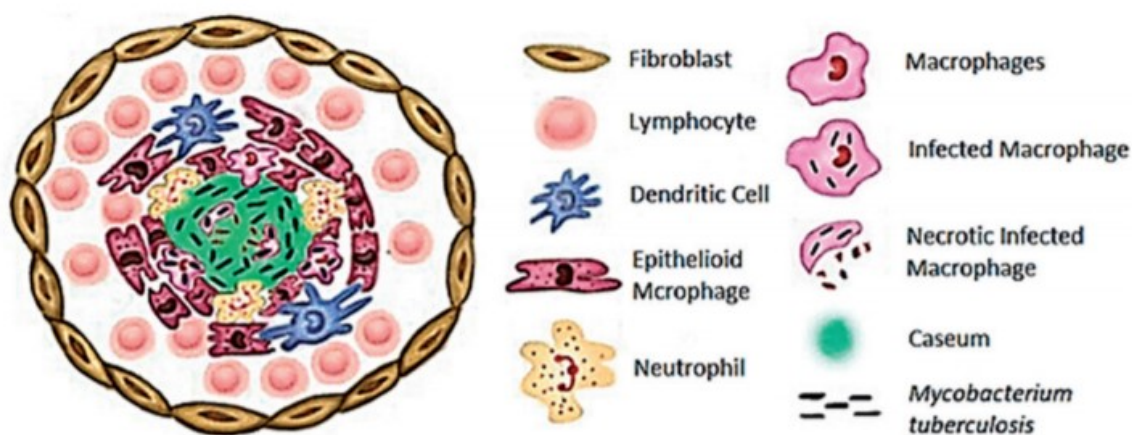
Mezi podmíněně patogenní druhy patří zejména *M. avium*, *M. intracelulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. xenopi*. *M. avium* se řadí do jednoho komplexu s *M. intracelulare* označovaného jako *Mycobacterium avium* complex (MAC). Jedná se o druhy, které většinou nejsou patogenní pro člověka. K jejich přenosu dochází nejčastěji

u imunokompromitovaných pacientů, například trpících AIDS. *M. kansasii* se nejčastěji vyskytuje ve vodovodních vývodech a je přenosné na člověka.³

3.2 Patofyziologie

Hlavním zdrojem nákazy TB je ve většině případů nemocný člověk. K přenosu onemocnění dochází inhalační cestou (kapénková infekce), přímým dotykem (inokulační forma) nebo alimentární cestou. Hlavní branou vstupu mykobakterií je ovšem dýchací ústrojí a k přenosu onemocnění dochází zejména inhalací kapének, které vykašlává nakažená osoba.

Tuberkulóza je charakteristická dvěma základními projevy, a to tvorbou uzlíku a exsudátu. Tuberkulózní (miliární) uzlík je kulovitý útvar tvořený epitheloidními a Langhansovými buňkami, které jsou obklopeny lymfocyty (Obrázek 1). Tuberkulózní exsudát je podobný serofibrinóznímu nespecifickému zánětu. Může obsahovat malé množství makrofágů s fagocytovanými mykobakteriemi a lymfocyty. Exsudát často podléhá tzv. kaseifikaci (zesýrovatění), které může přecházet i na okolní tkáňové struktury.^{6,9}



Obrázek 1: Tuberkulózní uzlík. Se svolením převzato z: Bouz, G., and Al Hasawi, N. (2018) The zebrafish model of tuberculosis - no lungs needed, *Critical Reviews in Microbiology* 44, 779-792. Dostupné na: www.tandfonline.com

Průběh plicní TB se dělí v zásadě na dvě části, a to na primární infekci a postprimární neboli sekundární infekci. Primární infekce nastává ve chvíli prvního kontaktu s mykobakterií. Ta se za vhodných podmínek dostává do plic a zde je fagocytována makrofágy. Mykobakterie jsou ovšem schopné přežít uvnitř makrofága a způsobují lokální exsudativní zánětlivou reakci, při níž dochází k aktivaci T lymfocytů a zvýšené

produkci Th1 buněk. Tyto buňky pak produkují chemotakticky působící mediátory, zejména IL2 a INF γ , jimiž přitahují monocyty, které se diferencují na makrofágy. Makrofágy pohlcující mykobakterie se dále přeměňují na epitheloidní buňky, případně mnohojaderné Langhansovy buňky, a ze zdravé tkáně vzniká tzv. granulom. Již za několik hodin dochází k rozšíření bakterie lymfatickou cestou do lymfatických uzlin. Tyto uzliny se pak zvětšují a vytvářejí společně se zánětem v plicích tzv. primární tuberkulózní komplex.^{7,9}

Primární infekce probíhá zejména v dětském věku. Často bývá asymptomatická a v 90 % se spontánně sama zhojí. Dojde přitom ke vzniku přecitlivělosti na tuberkulin jako znak získané imunity, zprostředkované paměťovými T lymfocyty. Mykobakterie mohou být úplně eliminovány nebo zůstanou v organismu ve spící formě. V ostatních případech může dojít k progresi primární infekce a kaseifikaci (zesýrovatění) až kavernizaci (vznik dutiny). TB se takto může šířit dále a dojde k bronchogennímu rozsevu. Mykobakterie se také může šířit krevní cestou do dalších částí plic a dalších orgánů (časná primární generalizace).^{8,9}

Postprimární infekce nastává u osob již jednou infikovaných (senzibilizovaných), kteří jsou po dlouhém období latence. Ke vzniku postprimární infekce vedou dvě cesty. První cestou je opětovné setkání s mykobakterií z vnějšího prostředí zprostředkované nakaženou osobou. Druhou cestou je reaktivace „spících“ mykobakterií z primárního tuberkulózního komplexu. Postprimární TB je spojena s izolovaným orgánovým postižením (pulmonární, extrapulmonární TB). Hojení plicních lézí je spojeno se zmnožením kolagenního vaziva a s fibrotizací plic. Klíčovou roli při vzniku postprimární TB hraje stav imunitního systému organismu. Příčiny reaktivace infekce nejsou zcela objasněny. Nicméně víme, že vyšší pravděpodobnost reaktivace latentní TB je u osob se sníženou funkcí imunitního systému. Z toho vyplývají i hlavní rizikové faktory onemocnění jako je věk, imunosupresivní léčba, diabetes, poškození jater, HIV infekce.^{9,10}

3.3 Rezistence

Celosvětově rezistence na antituberkulotika narůstá a je stále větší hrozbou pro společnost. Rezistenci na antituberkulotika můžeme rozdělit na primární a sekundární. Primární rezistence je stav, kdy člověk, který nebyl dosud léčený antituberkulotiky je infikován rezistentním kmenem. Sekundární rezistence je naopak stav, kdy člověk byl

infikován nerezistentním kmenem TB, ale z důvodu špatné terapie (nedostatečná délka, špatně zvolený režim, špatná compliance pacienta) došlo k rozvoji rezistence.

WHO definuje pět základních typů rezistence.¹¹

1. **Mono-resistance:** Jedná se o rezistenci TB pouze proti jednomu z antituberkulotik první linie.
2. **Poly-resistance:** Je rezistence proti více než jednomu z antituberkulotik první linie. Nesmí se však jednat o rezistenci k isoniazidu a rifampicinu současně.
3. **Multidrug-resistance (MDR):** Rezistence alespoň proti isoniazidu a zároveň rifampicinu.
4. **Extensive drug-resistance (XDR):** Rezistence k jakémukoliv fluorochinolonu a alespoň proti jednomu ze tří injekčních antituberkulotik druhé linie (kapreomycin, kanamycin, amikacin) a zároveň se musí jednat o multidrug rezistenci (MDR-TB).
5. **Rifampicin-resistance (RR):** Rezistence k rifampicinu. Může zahrnovat jakýkoliv typ rezistence k rifampicinu ať už ve formě mono, poly, MDR nebo XDR rezistence.

Někdy se ještě rozlišuje tzv **totally drug-resistant TB** (volně přeloženo totálně rezistentní tuberkulóza). Nicméně tento druh rezistence nebyl doposud pro TB jasně definován, a proto ho zde neuvádím.

Celosvětově bylo v roce 2017 ohlášeno 160 684 případů MDR/RR-TB, což značí menší nárůst oproti roku 2016. Z těchto případů zhruba 87 % pacientů bylo zapsáno na léčbu léčivy 2. linie. Nejpresnější odhady tvrdí, že v roce 2017 se celosvětově u 558 000 lidí rozvinula RR-TB (rozsah 483 000-639 000), rifampicin je přitom nejefektivnějším antituberkulotikem 1. linie. Z toho 82 % lidí se odhaduje, že mělo MDR-TB. Téměř polovina z celosvětových případů MDR/RR-TB pochází z těchto tří zemí: Indie (24 %), Čína (13 %) a Rusko (10 %). Úspěšnost léčby rezistentních kmenů TB zůstává malá, celosvětově zhruba 55 %.¹²

3.4 Vakcinace

Jedním z historicky důležitých pokroků v oblasti terapie TB byl samotný objev očkování proti TB. Vakcína byla připravená z původně patogenního kmene *M. bovis*, který byl dlouhodobým pasážováním na zbaven virulence. Takto vznikl kmen *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette Guérin), který se používal k očkování a imunomodulační terapii. V současnosti je BCG vyvinutý skoro před 100 lety jedinou dostupnou a zároveň nejrozšířenější vakcínou po celém světě. Bohužel tato vakcína neposkytuje stoprocentní ochranu proti rozvoji onemocnění. Je efektivní zejména proti rozvoji

dětské TB a rozvoji extra-pulmonálních forem TB, kde poskytuje 60–80% ochranu.¹³ Navíc se efekt poskytovaný vakcínou dětem časem vytrácí. BCG poskytuje dost nekonsistentní ochranu proti pulmonálním formám TB a je takřka neefektivní, pokud se podává v dospělosti.¹⁴ Vzhledem ke své nízké efektivitě na pulmonální formy není dostatečným řešením pro postižené země.

3.5 Léčba

Při léčbě tuberkulózy všech lokalizací jsou základní cíle stejné: vyléčení nemocného při zachování kvality života a produktivity, zabránit úmrtí na aktivní TB, zabránit rozvoji pozdních komplikací, eliminovat riziko relapsu onemocnění, minimalizovat možnost přenosu TB a zabránit rozvoji lékové rezistence. Léčba TB vyžaduje komplexní dlouhodobou terapii. Minimální délka terapie antituberkulotiky trvá šest měsíců (v optimálním případě bez komplikací). Při léčbě TB se uplatňuje tzv. multiple target therapy, to znamená, že k eradikaci mykobakterie z lidského organismu používáme kombinaci hned několika léčiv s různými mechanismy účinku. Z pohledu terapie můžeme léčiva používající se na léčbu TB rozdělit na dvě skupiny: a) léčiva první volby, b) léčiva druhé volby. Mezi léčiva první volby patří isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid. Streptomycin se nachází na pomezí léčiv první a druhé volby a volí se většinou pouze u rezistentní TB, recidivách onemocnění, případně u TB centrální nervové soustavy (CNS).¹⁵ Podávání kombinace léčiv probíhá ve speciálním režimu DOTS (Directly Observed Treatment, Shortcourse). To znamená, že se léky berou v jednorázové ranní dávce pod kontrolou ošetřujícího personálu.

Strategie léčby TB se liší podle druhu pacienta, zda se jedná o pacienta doposud neléčeného antituberkulotiky nebo jde o pacienta s recidivující TB nebo o pacienta infikovaného multirezistentními kmeny mykobakterií. Iniciální fáze léčby v ČR probíhá za hospitalizace a trvá minimálně dva měsíce. V iniciální fázi léčby podáváme kombinaci 4 antituberkulotik (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol). Po uplynutí iniciální fáze nastává fáze pokračovací, která probíhá ambulantně po dobu minimálně 4 měsíců. V pokračovací fázi podáváme kombinaci dvou antituberkulotik (isoniazidu a rifampicinu). Během prvních dvou měsíců antituberkulózní léčby vykazují viabilní mykobakterie ze sputa dvojfázovou křivku usmrcení.¹⁵ To nám napovídá, že mykobakteriální populace se skládá nejméně ze dvou subpopulací, které odlišně reagují na léčbu. Jedna subpopulace se skládá z rychle se dělících mykobakterií a je okamžitě usmrcena. Druhá se skládá převážně z pomalu se dělících a nedělících mykobakterií, a

proto reaguje na léčbu pomaleji. Tato odlišná reakce na léčbu v rámci jedné populace mykobakterií je důvodem, proč se během terapie kombinují účinky několika léčiv. Některá antituberkulotika mají schopnost usmrtit převážně rychle se dělící mykobakterie, to znamená, že jsou baktericidní (isoniazid, v menší míře též rifampicin a streptomycin).¹⁶ Jiná antituberkulotika mají naopak účinek sterilizační, a to znamená schopnost usmrtit semidormantní mykobakterie (rifampicin, pyrazinamid).¹⁶ Nakonec se do kombinace přidávají antituberkulotika, která mají za úkol snížit riziko rozvoje rezistence (isoniazid a rifampicin, méně streptomycin, ethambutol a pyrazinamid).¹⁶ I přesto ale nemá tato kombinovaná léčba u některých pacientů dostatečný účinek, protože část mykobakterií může být uschována ve formě tzv. granulomů v určitých kompartmentech, jako jsou například různé abscesy a kavity. Tyto kompartmenty jsou pro léčiva jen velice těžko dostupné a stávají se z nich „rezervoáry“ spících mykobakterií. Tyto sekvestrované a spící mykobakterie jsou pak příčinou recidiv TB. Dále je nutno podotknout, že čím déle člověk setrvá bez léčby, tím více takových uschovaných granulomů se vytvoří.¹⁵ Vzhledem k tomu, že se účinnost některých antituberkulotik při podávání s potravou snižuje, tak je zde opodstatněné jejich jednorázové podávání na lačno v jedné ranní dávce.¹⁵

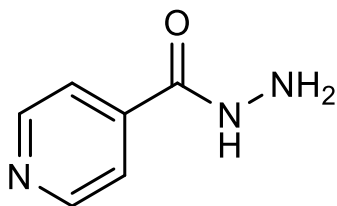
Výjimečný léčebný režim si vyžaduje léčba mykobakteriální infekce rezistentní na isoniazid při zachovalé citlivosti na rifampicin. V tomto případě se režim léčby skládá z denního podávání kombinace rifampicinu, ethambutolu, pyrazinamidu a levofloxacinu po dobu 6 měsíců. Před zahájením léčby se doporučuje vyšetřit citlivost k fluorochinolonům.¹⁷ Mnohem komplikovanější situace však nastává při léčbě pacientů, kteří již jednou byli léčeni antituberkulotiky. Tito pacienti jsou nejčastějšími nositeli rezistentních mykobakteriálních infekcí. Z rezistentních mykobakteriálních infekcí je důležité včas diagnostikovat zejména MDR-TB. Pokud jde o již léčeného pacienta, tak se nový léčebný režim stanovuje na základě výsledků vyšetření citlivosti k antituberkulotikům.¹⁸ Standardizovaný režim s pětikombinací antituberkulotik se streptomycinem v iniciální fázi se již nemá u těchto pacientů používat. Pokud má pacient prokázanou MDR-TB pak se volí speciální režim léčby, který neobsahuje isoniazid a rifampicin. Jednou z možností je podávání pětikombinace moxifloxacinu, bedachilinu, linezolidu, cykloserinu a klofaziminu po dobu 6 měsíců následované podáváním trojkombinace moxifloxacinu, cykloserinu a klofaziminu po dobu 14 měsíců. Podávání kanamycinu a kapreomycinu se nedoporučuje.¹⁹

Ve velmi speciálních případech, zejména když se jedná o infekci XDR, přikročí lékaři k léčbě chirurgické, při které se odstraňuje perzistující kaverna z plic.¹⁵

Taktika léčby TB rozdělila léčiva použitelná v terapii na dvě skupiny, léčiva první linie a léčiva druhé linie.

3.5.1 Léčiva první linie

3.5.1.1 Isoniazid



Isoniazid zůstává stále základním léčivem pro terapii TB. Všem pacientům s nemocí způsobenou citlivými kmeny, kteří ho tolerují, by měl být nasazen. Jedná se o proléčivo, které je mykobakteriálním enzymem kataláza-peroxidázou přeměněno na aktivní formu. Takto aktivovaný isoniazid inhibuje syntézu dlouhých mykolových kyselin uvnitř mykobakterie. Mykolové kyseliny jsou specifické právě pro mykobakterie a podílejí se na stavbě buněčné stěny. Cílem aktivované formy isoniazidu je enzym enoyl-ACP reduktáza (InhA, součást komplexu FAS II), který se účastní při syntéze mastných kyselin. Enoyl-ACP reduktáza konvertuje nenasycené mastné kyseliny na nasycené mastné kyseliny v biosyntéze mykolových kyselin. Isoniazid působí bakteriostaticky na neaktivní, nedělící se mykobakterie. Na aktivní, rychle se dělící extracelulární nebo intracelulární mykobakterie působí baktericidně.²⁰

Nejčastější mechanismus vzniku rezistence je způsoben mutací enzymu kataláza-peroxidázy, která sníží svou aktivitu a tím se sníží přeměna proléčiva isoniazidu do jeho aktivní formy. Mutace v genech kódujících biosyntézu mykolových kyselin je také možná. Při monoterapii TB isoniazidem dochází k rychlému vzniku rezistence. Pokud se isoniazid podává samostatně v profylaxi, k rozvoji rezistence nedochází.²⁰

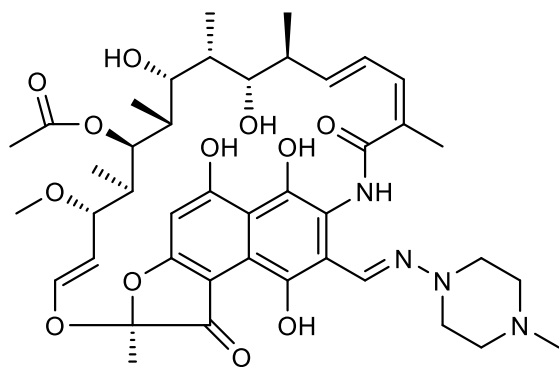
U lidí je hlavním vylučovaným produktem *N*-acetylisoniazid, jenž vzniká acetylací, a isonikotinová kyselina, která vzniká hydrolýzou. Proto z hlediska účinnosti a nežádoucích účinků hraje velkou roli rozdělení populace na rychlé a pomalé acetylátory. Důležitá je aktivita arylamin *N*-acetyltransferázy typu 2, tento enzym je hlavním inaktivačním enzymem isoniazidu. Plazmatický poločas léčiva u rychlých

acetylátorů je zhruba 1 hodina, oproti tomu u pomalých acetylátorů 2–5 hodin. Z toho vyplývá, že pomalí acetylátory jsou více náchylní k nežádoucím účinkům léčiva. Dalším důležitým farmakokinetickým faktorem isoniazidu, který je potřeba zmínit, je skutečnost, že se léčivo přes isoformu enzymu CYP2E1 může přeměnit na toxické metabolity. To je nebezpečné zejména u alkoholiků, kteří mají indukovanou právě tuto isoformu enzymu.²⁰

Isoniazid je nejdůležitějším léčivem v léčbě TB. Pro léčbu aktivní infekce se používá v kombinaci s ostatními léčivy. Při profylaktickém použití se podává samostatně.²⁰

Mezi nejčastější nežádoucí účinky isoniazidu patří postižení nervové soustavy z důvodu metabolické interference s tvorbou vitamínu B6. Dalším častým nežádoucím účinkem je postižení jaterních funkcí. Dále se mohou vyskytovat nauzea, zvracení, dyspepsie, kožní vyrážky.²⁰

3.5.1.2 Ansamycinová antibiotika (rifampicin, rifabutin, rifapentin)



rifampicin

Rifampicin, rifabutin a rifapentin patří do skupiny ansamycinových antibiotik, která jsou produkována *Amycolatopsis mediterranea*. Jedná se o semisyntetické deriváty rifamycinu B.

Rifampicin působí jako inhibitor DNA dependentní RNA polymerázy tím, že s ní vytvoří stabilní komplex. To má za následek potlačení iniciace při tvorbě RNA řetězce, neinhibuje však elongaci při tvorbě RNA řetězce. Vysoké koncentrace rifampicinu mohou inhibovat RNA syntézu i v savcích mitochondriích, virovou DNA dependentní RNA polymerázu a reverzní transkriptázu. Rifampicin působí baktericidně jak na intracelulární, tak extracelulární patogeny. Rifampicin inhibuje růst jak gram negativních, tak gram pozitivních bakterií. Inhibuje růst *M. tuberculosis*,

Mycobacterium kansasii. Většina ostatních mykobakteriálních kmenů je rifampicinem potlačena, jako např: *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium intracellulare*, a *M. avium*. Určité kmeny jsou naopak vůči účinkům rifampicinu rezistentní, zejména *Mycobacterium fortuitum*. Rifampicin zvyšuje *in vitro* aktivitu streptomycinu a isoniazidu proti *M. tuberculosis*.²⁰

Rezistence k rifampicinu je způsobena mutací DNA dependentní RNA polymerázy, která zmutovaná má slabší vazbu s rifampicinem. Rezistence k tomuto léčivu vzniká snadno a rychle, proto by se neměl používat v monoterapii.²⁰

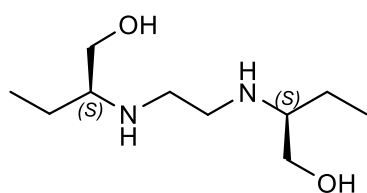
Rifampicin se vylučuje zejména žlučí a podléhá enterohepatálnímu oběhu. Během svého kolování skrze játra je rychle deacetylován jaterními cytochromy, po 6 hodinách je skoro veškeré množství léčiva ve žluči v deacetylované formě, která je sice stále aktivní, ale intestinální reabsorpce žlučí je deacetylací výrazně snížena. Tím se i rapidně snižuje plazmatický poločas léčiva. Rifampicin je významným induktorem jaterních enzymů a P-glykoproteinu, z toho důvodu je poločas léčiva podávaného opakovaně kratší než při první dávce. Je to dáno indukcí jaterních enzymů, které deacetylují rifampicin. Jelikož je rifampicin vylučován zejména žlučí, tak upravení dávky u pacientů s renální insuficiencí není potřeba.²⁰

Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky rifampicinu patří porucha krvevorbny. Zejména se jedná o akutní hemolytickou anémii, trombocytopenii a agranulocytózu. Dalšími nežádoucími účinky rifampicinu jsou nauzea, nechutenství, zvracení, bolesti břicha a průjem, který může vést až k rozvoji pseudomembranózní kolitidy. Dalším závažným nežádoucím účinkem rifampicinu je poškození jater až hepatitida. Z tohoto důvodu je nezbytné sledovat jaterní testy. Rifampicin způsobuje červené zbarvení moči, sputa a slz. Zabarveny mohou být i kontaktní čočky.^{15, 20}

Rifapentin je derivát rifampicinu se stejným mechanismem účinku. Významněji se od rifampicinu liší pouze delším eliminačním poločasem a menší schopností indukovat jaterní cytochromy. Díky svému dlouhému poločasu se může podávat jednou týdně.²⁰

Rifabutin je derivát, který nejméně indukuje jaterní cytochromy, proto se s výhodou používá při léčbě pacientů trpících TB a současně HIV, kteří jsou současně léčeni inhibitory proteáz.²⁰

3.5.1.3 Ethambutol



Skoro všechny kmeny *M. tuberculosis* a *M. kansasii* a mnoho kmenů z MAC jsou citlivé k účinkům ethambutolu. Citlivost ostatních mykobakterií je různá. Ethambutol nepůsobí na jiné bakterie. Mechanismus účinku ethambutolu spočívá v inhibici enzymu arabinosyl transferázy, který se podílí na biosyntéze buněčné stěny. Ethambutol je účinný proti rostoucím mikroorganismům, naopak jeho sterilizační aktivita je malá.²⁰

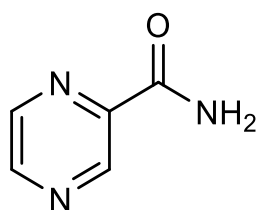
Účinek ethambutolu je považován za bakteriostatický.²⁰

Ethambutol se vstřebává z gastrointestinálního traktu (GIT) zhruba z 80 %. Plazmatický poločas ethambutolu je 3–4 hodiny. Vylučuje se zejména močí, po 24 hodinách se vyloučí 75 % z podané dávky ethambutolu v nezměněné formě, až 15 % je vyloučeno ve formě aldehydu a dikarboxylové kyseliny.²⁰

Použití ethambutolu přináší výsledky zejména v kombinaci s isoniazidem. Podává se v jedné denní dávce.

Podávání ethambutolu může vést k hyperurikemii, to je nebezpečné zejména u pacientů trpících dnou, jelikož může dojít k jejímu razantnímu zhoršení. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem ethambutolu je poškození zraku manifestované jako retrobulbární neuritida, může dojít ke snížení zrakové ostrosti, zúžení zorného pole a rozvoji červenozelené barvosleposti. Tento nežádoucí účinek je vázán zejména na distomer ethambutolu tedy L-formu. Nicméně i při využívání eutomeru byly reportovány tyto nežádoucí účinky v závislosti na velikosti dávky a délce trvání terapie. Postiženo může být jen jedno nebo obě oči. Proto jsou před zahájením a v průběhu léčby nutné pravidelné kontroly oftalmologem.^{15,20}

3.5.1.4 Pyrazinamid



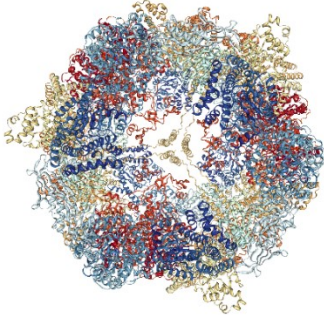
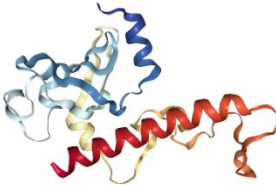
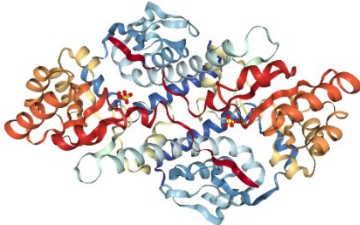
Pyrazinamid (PZA) je syntetickým analogem nikotinamidu s tím rozdílem, že jádro netvoří pyridin ale pyrazin.

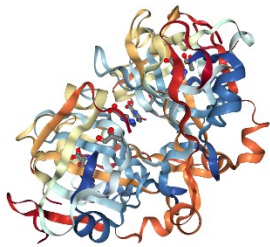
Pyrazinamid je považován za proléčivo, které po překročení mykobakteriální buněčné stěny procesem pasivní difuze a pravděpodobně i aktivním transportem je převedeno do své aktivní formy pomocí mykobakteriálního enzymu nikotinamidázy/ pyrazinamidázy (PZáza).²¹ Uvnitř bakterie je PZA pomocí PZázy převeden na pyrazin-2-karboxylovou kyselinu (POA). K PZA je citlivý zejména kmen *M. tuberculosis*, to je vysvětlováno deficitem efluxních mechanismů pro POA, na rozdíl od *M. smegmatis*, který vykazuje nízkou citlivost na PZA a disponuje vysoce aktivními efluxními mechanismy.²² Aktivita PZA se na rozdíl od ostatních antituberkulotik zdá být velice závislá na vlastnostech prostředí. Přestože byla prokázána aktivita PZA při jiném než kyselém prostředí *in vitro*.²³ Jeho sterilizační aktivita v kaseózním granulomu při jiném než kyselém pH se neprokázala. Je tak patrné, že kyselé pH hraje určitou roli v aktivitě PZA uvnitř granulomu, ale otázkou zůstává nakolik je ta role významná a jakou měrou se na ní podílejí ostatní faktory prostředí.²⁴

Původně se předpokládalo, že by mechanismus účinku PZA mohl být takový, že se aktivovaný na POA akumuluje uvnitř buňky a způsobuje okyselení mykobakteriální cytoplasmy. Toto okyselení by pak mělo za následek kolaps membránového potenciálu a transportu.²¹ Tento nespecifický mechanismus účinku byl nedávno vyvrácen experimentálním měřením, jímž se zjistilo, že takový efekt PZA/POA je zanedbatelný v koncentracích menších než 10ti násobek minimální inhibiční koncentrace.²⁵ Předpokládá se také, že by PZA a POA mohla inhibovat syntézu mykolových kyselin pomocí inhibice syntázy mastných kyselin typu 1 (FAS I). Musíme však podotknout, že toto tvrzení je stále zpochybňováno.^{26,27} Dalším stále častěji skloňovaným cílem POA může být ribosomální protein S1 (RpsA), jehož ovlivnění by mělo za následek inhibici translace proteinů. Ukazuje se totiž, že mutace genu kódující tento protein má za následek rezistenci k PZA.²⁸ Mezi další možné cíle PZA patří inhibice chinolové

kyseliny fosforibosyl transferázy (QAPRTázy). Inhibicí katalytické aktivity QARPTázy by došlo k narušení de novo biosyntézy nikotinamidu (NAD).²⁹ Dalším možným mechanismem účinku POA by mohla být inhibice enzymu guanosin pentafofát syntázy (Gps1). Gps1 se podílí na metabolismu nukleových kyselin. Musíme však zmínit, že POA se váže na Gps1 pouze při extrémně vysokých koncentracích (mM).³⁰ Posledním z předpokládaných mechanismů účinku by mohla být vazba POA na enzym aspartát dekarboxylázu (PanD). PanD je enzym, který se podílí na biosyntéze Koenzymu A. Vazbou POA na PanD dochází ke konformačním změnám, které mají za následek zvýšený rozklad PanD pomocí komplexu ClpC1-ClpP.^{31,32}

Tabulka 1: Potencionální cíle strukturně specifického působení PZA

Cíl PZA/POA	PDB kód	Struktura enzymu
FAS I	6GJC	
RpsA	4NNG	
QAPRTáza	1QPQ	

PanD POA	v komplexu	6OYY	
Gps1		nenalezeno [10.3.2020]	nenalezeno [10.3.2020]

Pokud je pyrazinamid použit samostatně, tak k rozvoji rezistence dojde rychle.

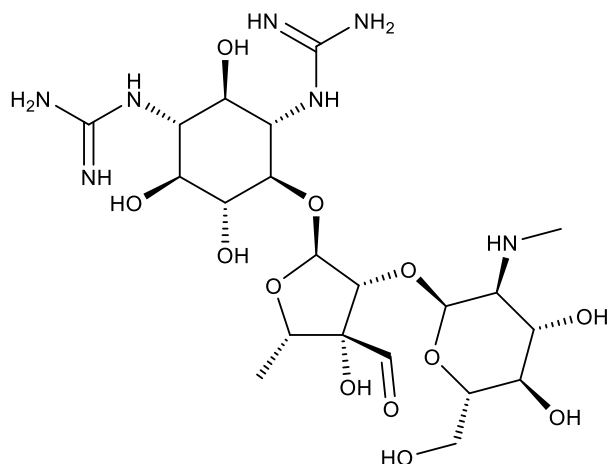
Pyrazinamid se dobře absorbuje z GIT a distribuuje se do celého těla včetně CNS, plic a ledvin. Plasmatický poločas je 9–10 hodin u pacientů s normální renální funkcí. Pyrazinamid se vylučuje převážně glomerulární filtrací, je hydrolyzován na pyrazinovou kyselinu a následně hydroxylován na 5-hydroxypyrazinovou kyselinu.²⁰

Význam použití pyrazinamidu tkví zejména v jeho baktericidním účinku proti *Mycobacterium tuberculosis*. S výhodou účinkuje na semi-dormantní bacily. Pyrazinamid má významný účinek zejména v počátečních fázích léčby a přidává se do kombinační léčby z toho důvodu, že významně zkracuje délku antituberkulotické léčby z 9–12 měsíců na 6 měsíců.²² Pro dospělé je denní dávka pyrazinamidu 15–30 mg/kg tělesné hmotnosti, přičemž maximální denní dávka je 2 g. U dětí je dávkování obdobné.^{15, 20}

Mezi časté nežádoucí účinky patří nauzea, myalgie, artralgie, kožní vyrážka. Ze závažnějších nežádoucích účinků je třeba zmínit poruchu funkce jater, která může být důvodem přerušování léčby. Proto by se během léčby měly pravidelně monitorovat jaterní funkce. Pyrazinamid inhibuje exkreci kyseliny močové, proto dalším závažným nežádoucím účinkem je zvýšení kyseliny močové v krvi. To může ve vzácných případech vyústit v záchvat dny.^{15,20}

3.5.2 Léčiva 2.linie

3.5.2.1 Streptomycin



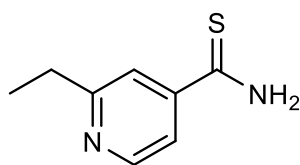
Jedná se o zástupce ze skupiny aminoglykosidových antibiotik. Je zároveň prvním antibiotikem, které bylo možné použít při léčbě TB. V současnosti je v České republice dostupnost tohoto léčiva dost omezená. Vzhledem k tomu, že se málo používá, se firmám nevyplácí platit za jeho registraci. Dostupný je proto pouze na mimořádný dovoz.^{15, 20}

In vitro vykazuje streptomycin vůči mykobakteriálním bacilům baktericidní účinek. *In vivo* je ovšem eradikovat neumí. Pravděpodobně proto, že nedokáže proniknout do živých buněk, a tak nedokáže zabít intracelulární mikroorganismy. Většina kmenů *M. tuberculosis* je vůči působení streptomycinu citlivá. Bohužel ostatní mykobakteriální kmeny jsou citlivé pouze výjimečně. Mechanismus účinku aminoglykosidů spočívá v interferenci se syntézou bakteriálních proteinů. Aminoglykosidy způsobují chybné čtení a předčasně ukončení translace mRNA.²⁰

Streptomycin se používá zejména při léčbě recidiv TB. Je kontraindikován v těhotenství z důvodů teratogenity, protože je u něj riziko poškození sluchu plodu.²⁰

Hlavním a nejzávažnějším nežádoucím účinkem streptomycinu je ototoxicita. Strach z rizika nevratného poškození sluchu navíc vedl k omezení používání streptomycinu. Mezi další nežádoucí účinky patří nefrotoxicita a neurotoxicita.^{15, 20}

3.5.2.2 Ethionamid



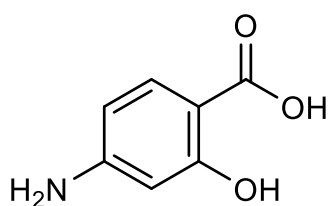
Ethionamid je proléčivo, které musí být aktivované NADPH specifickou monooxygenázou na sulfoxid a poté na 2-ethyl-4-aminopyridin. Mechanismus účinku ethionamidu je obdobný jako u isoniazidu a spočívá v inhibici enzymu enoyl-ACP reductázy (InhA) z komplexu syntázy mastných kyselin 2 (FAS II). Léčivo tak inhibuje tvorbu mykologických kyselin s následným poškozením buněčné stěny. Pokud je lék použit v monoterapii, tak rezistence na ethionamid vzniká velice snadno a je zde i malé riziko rozvoje křížové rezistence na isoniazid.²⁰

Plazmatický poločas léčiva je zhruba 2 hodiny. Více než polovina pacientů není schopna tolerovat jednotlivou dávku ethionamid nad 500 mg kvůli GIT potížím. Léčivo dobře prostupuje do celého organismu a dosahuje i významných koncentrací v mozkomíšním moku. Ethionamid se vylučuje zejména játry. Obdobně jako p-aminosalicylová kyselina i ethionamid inhibuje acetylaci isoniazidu.²⁰

Ethionamid se používá v terapii TB pouze společně s ostatními léčivy a nastupuje v případech, kdy je terapie léčivy první linie neúčinná nebo kontraindikovaná.²⁰

Mezi obvyklé nežádoucí účinky ethionamidu patří anorexie, nauzea vomitus a podráždění žaludku. Četné jsou taky neurologické symptomy jako deprese a ospalost. Křeče a periferní neuropatie jsou vzácné. Mezi další neurologické projevy patří poruchy čichu, rozostřené vidění, diplopie, parestázie a bolesti hlavy. Pro úlevy od neurologických nežádoucích účinků můžeme použít pyridoxine. Hepatitida se objevila v 5% případů, po ukončení léčby zmizí, proto je při léčbě ethionamidem potřeba pravidelně kontrolovat jaterní funkce.^{15, 20}

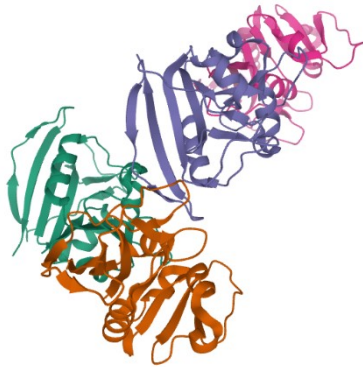
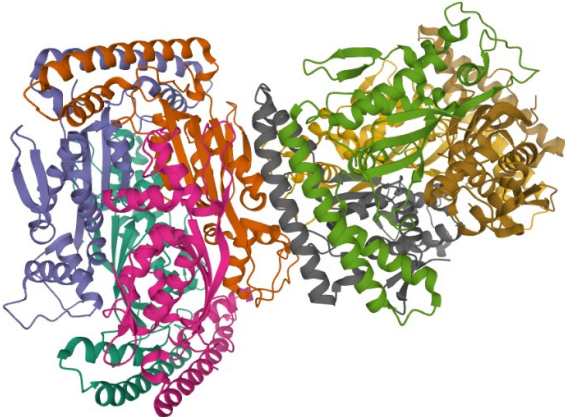
3.5.2.3 *p*-aminosalicylová kyselina (PASA)



PASA je obecně uváděna, jako bakteriostatické léčivo. Nicméně nedávno byl pozorován i bakteriocidní efekt na některé populace metabolicky aktivních mykobakterií.³³

PASA je jedním z mnoha léčiv, které ani po 60 letech klinického používání stále nemají zcela objasněný mechanismus účinku. Nejnovější studie naznačují, že by PASA mohla fungovat jako proléčivo, které kompetuje s *p*-aminobenzoovou kyselinou (PABA), nebo přesněji, působí jako její antimetabolit. PABA je nezbytnou součástí biosyntézy kyseliny listové uvnitř mykobakterií. Za normálních podmínek dochází k inkorporování PABA k 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrofosfátu za pomoci enzymu dihydropteroátsyntázy (DHPS) a dojde ke vzniku 7,8-dihydropteroátu. Ten je pak enzymem dihydrofolátsyntázou (DHFS) nejdříve přeměněn na 7,8-dihydrofolát a následně enzymem dihydrofolátreduktázou (DHFR) na 5,6,7,8-tetrahydrofolát. Ve chvíli, kdy ale do biosyntézy kyseliny listové vstoupí PASA, dojde za pomoci DHPS ke tvorbě hydroxyl-dihydropteroátu. Hydroxyl-dihydropteroát je enzymem DHFS přeměněn na hydroxyl-dihydrofolát. Nově vzniklý hydroxyl-dihydrofolát funguje jako inhibitor enzymu DHFR a zabraňuje tak tvorbě kyseliny listové.³⁴ Nejnovější studie ukazují, že by metabolity PASA mohli inhibovat také flavin-dependentní thymidylát syntázu. Tím by došlo k narušení syntézy thymidinu, jako jedné ze základních nukleových kyselin.³⁵

Tabulka 2: Potencionální cíle strukturně specifického působení PASA

Cíl PASA	PDB kód	Struktura enzymu
DHFR	6DDS	
Flavin-dependentní thymidylát syntáza	2AF6	

Další potencionální mechanismus účinku PASA může být chelatace železa. V tomto případě by PASA působila nikoliv jako proléčivo, ale jako léčivo, které by přerušovalo získávání mykobakteriálního železa nekompetitivní inhibicí inkorporace salicylátů do mykobakteriálních sideroforů, nejčastěji mykobaktinu a karboxymyaktinu.^{36, 37, 38}

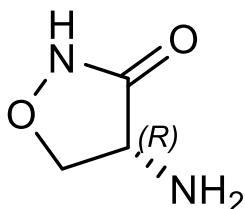
PASA se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu. Špatně se však distribuuje do cerebrospinální tekutiny. Plazmatický poločas je 1 hodina, plazmatické koncentrace jsou zanedbatelné za 4–5 hodin po podání jednotlivé dávky. Léčivo se vylučuje až z 80 % ledvinami. Z toho důvodu by se nemělo používat při renální insuficienci.²⁰

PASA se podává perorálně v dávce 10–12 g/den. Tato dávka se obvykle rozděluje do 2–4 stejných dávek v průběhu dne, které se podávají po jídle, aby se předešlo

podráždění žaludku. Děti obvykle dostávají dávku 150–300 mg/kg/den rozdělených opět do 3–4 stejných dávek v průběhu dne.²⁰

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří GIT problémy, zejména anorexie, nauzea a průjem. Tyto nežádoucí účinky jsou pak nejčastějším důvodem non-adherence k léčbě. Pacienti s peptickým vředem léčbu málokdy tolerují. Až u 10 % pacientů může být pozorována hypersenzitivní reakce. Může se objevit horečka, slabost, bolest kloubů, bolest v krku. Vyrážka se objevuje samostatně nebo v kombinaci s horečkou. Mezi závažné nežádoucí účinky patří hematologické abnormality, jako je např. leukopenie, agranulocytóza, eozinofilie, trombocytopenie a hemolytická anemie.²⁰

3.5.2.4 Cykloserin



Jedná se o širokospektré antibiotikum, které se používá v kombinální terapii TB, když selžou léčiva první linie. Jedná se o D-4-amino-isoxazolidin-3-on.

Výhodou cykloserinu je, že nezpůsobuje vznik zkřížené rezistence mezi ním a ostatními antituberkulotiky.²⁰

Cykloserin je strukturním analogem D-alaninu. Cykloserin na základě své analogie, inhibuje reakci, při které je D-Ala zahrnut do tvorby buněčné stěny.²⁰

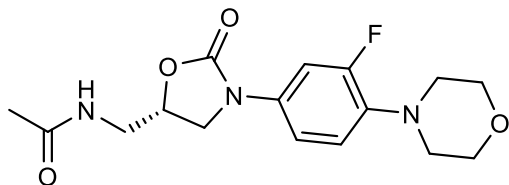
Perorálně podaný se absorbuje ze 70–90 %. Cykloserin se skvěle distribuuje do tkání, dobré distribuce dosahuje i v mozkomíšním moku. Zhruba 50 % parenterálně podané dávky cykloserinu se vylučuje v nezměněné podobě močí během prvních 12 hodin. Zvýšené riziko toxicity hrozí u pacientů s renální insuficiencí. V takových případech musí být cykloserin odstraněn pomocí hemodialýzy.²⁰

Cykloserin se používá při opakované léčbě TB nebo v případě rezistence na ostatní léčiva.²⁰

Problémem je častá neurotoxicita. Mezi klasické nežádoucí účinky patří podráždění CNS, které mizí po vysazení léčiva. Nejčastěji se jedná o somnolenci, bolesti hlavy, třes, vertigo, zmatenost, nervozitu, podráždění, paranoidní a katatonické reakce,

hyperreflexie, parézy a epileptické záchvaty. Cykloserine je kontraindikován u pacientů trpícími v minulosti epilepsií. Opatrně by se měl používat u lidí s depresí.²⁰

Linezolid



Linezolid je syntetické léčivo ze skupiny oxazolidinonů.

Díky svému unikátnímu mechanismu účinku se jedná o léčivo, které se používá výhradně na léčbu rezistentních patogenů (nejen TB). Jedním z takových rezistentních patogenů, na které se s výhodou používá, je i MDR-TB.²⁰

Linezolid inhibuje syntézu proteinů tak, že se váže na 50S podjednotku ribozomu a zabraňuje tak tvorbě komplexu ribozom-fMet-tRNA, který zahajuje syntézu proteinu. Jelikož má unikátní mechanismus účinku, nevzniká na linezolid zkřížená rezistence s ostatními léčivy z jiných skupin. Rezistence enterokoků a stafylokoků vzniká z důvodu bodové mutace 23S rRNA.²⁰

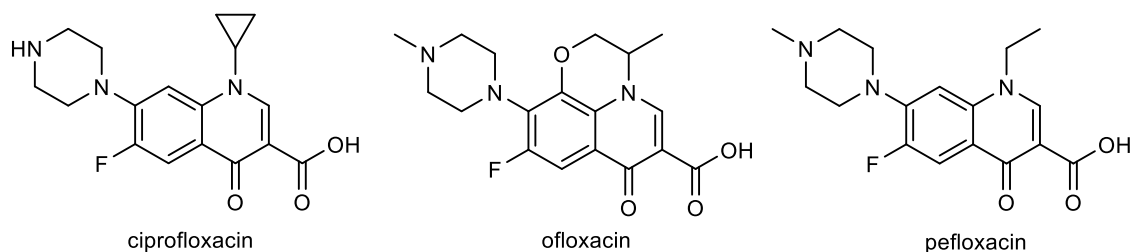
Linezolid se dobře vstřebává po perorálním podání. Zhruba 80 % léčiva se vylučuje močí, z toho 30 % je v aktivní formě a zbylých 50 % jako oxidované produkty. U lidí s renální insuficiencí není potřeba dávky upravovat.²⁰

Jak již bylo výše zmíněno, Linezolid by měl být šetřen jako léčivo určené pro infekce způsobené velice rezistentními kmeny bakterií.

Nežádoucí účinky

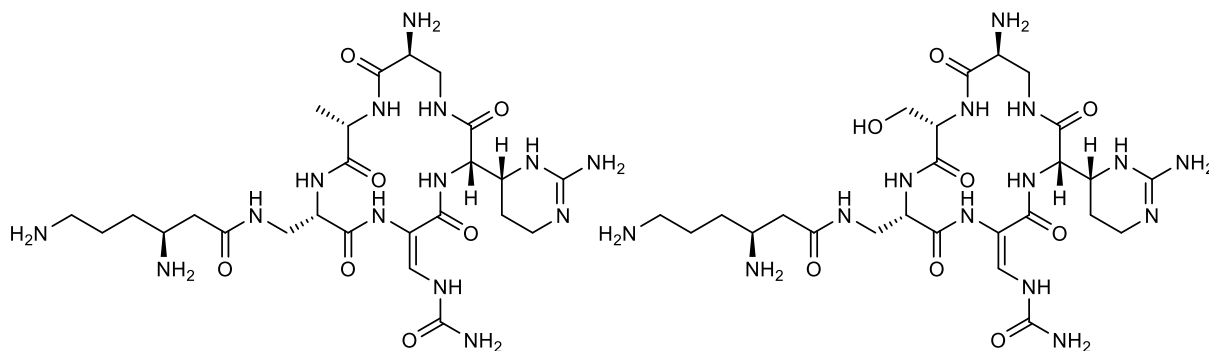
Mezi nejčastější nežádoucí účinky léčiva patří gastrointestinální potíže, bolesti hlavy a vyrážka. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky patří anemie, leukopenie, pancytopenie a trombocytopenie. Linezolid je slabým inhibitorem monoaminoxidázy (MOA), proto je kontraindikované jeho podání s jinými inhibitory MAO.²⁰

3.5.2.5 Fluorchinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin)



Fluorchinolony jsou vysoce aktivní proti *M. tuberculosis* a jsou velice důležitými léčivy při léčbě MDR-TB. Léčiva jako gatifloxacin a moxifloxacin jsou neaktivnější a nejméně náchylná k rozvoji rezistence. Nevýhodou chinolonů je možnost rozvoje zkřížené rezistence na celou skupinu.

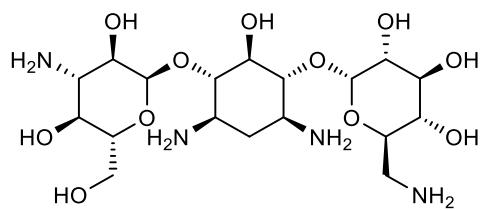
3.5.2.6 Kapreomycin



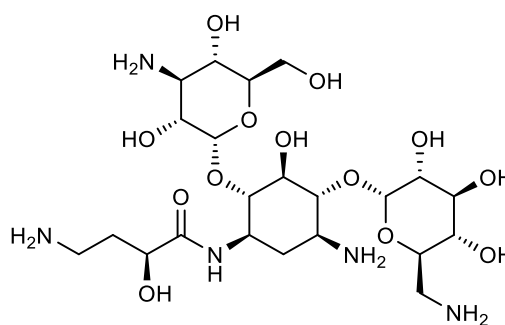
Jedná se o cyklické peptidové antibiotikum s obdobným mechanismem a nežádoucími účinky jako aminoglykosidová antibiotika. Jde o léčivo vyhrazené pouze pro léčbu rezistentních kmenů *M. tuberculosis* nebo jiných netuberkulózních mykobakterií. Musí se stejně jako aminoglykosidová antibiotika podávat parenterálně. Zejména díky své potencionální ototoxicitě a nefrotoxicitě se nesmí používat současně s aminoglykosidy.²⁰

Kapreomycin se zpracovává z bakterie *Streptococcus capreolus*. Bakteriální rezistence na kapreomycin vzniká, pokud je podáván v monoterapii. Takto může dojít i ke vzniku zkřížené rezistence s ostatními aminoglykosidy. Používá se pouze v kombináční léčbě s ostatními léčivy při terapii pulmonální TB, když baktericidní léčiva nejsou tolerovaná, nebo při terapii rezistentních kmenů. Kapreomycin se podává intramuskulárně. Nežádoucí účinky spojené s používáním kapreomycinu jsou ztráta sluchu, tinnitus, přechodná proteinurie a azotémie. Renální selhání se objevuje vzácně.²⁰

3.5.2.7 Aminoglykosidy (kanamycin, amikacin)



kanamycin



amikacin

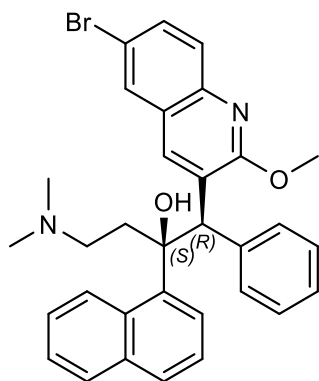
Léčiva z této skupiny se používají pro léčby rezistentních kmenů *M. tuberculosis* a jiných netuberkulózních mykobakterií. Podávají se parenterálně a pro své nežádoucí účinky nesmějí být podávány současně se streptomycinem a kapreomycinem.²⁰

Léčiva jsou extrémně aktivní proti některým mykobakteriálním druhům a mají významné postavení v léčbě nemocí způsobených netuberkulózními mykobakteriemi. Mezi aminoglykosidová léčiva patří samozřejmě i streptomycin, který byl díky svému významnému postavení v léčbě TB zmíněn zvlášť.

3.5.3 Nová léčiva

Významným krokem v léčbě tuberkulózy bylo objevení a registrace nových léčiv. Téměř po čtyřiceti letech tak byly registrovány nová antituberkulotika, bedachilin v roce 2012 a delamanid v roce 2013. Nová léčiva by měla být účinná zejména u citlivých, multirezistentních a snad i u extenzivně rezistentních mykobakteriálních kmenů.

3.5.3.1 Bedachilin



Jedná se o léčivo ze skupiny diarylchinolinů.

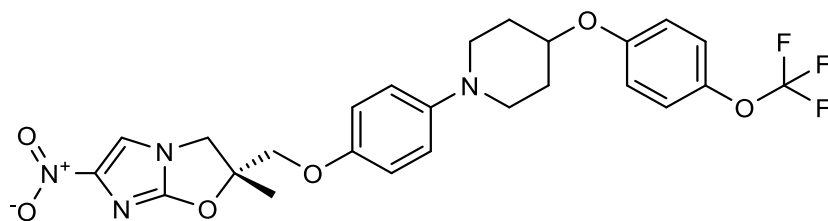
Léčivo selektivně blokuje F1/F0-ATP syntázu mykobaktérií, zároveň ale nemá žádný inhibiční efekt na savčí F1/F0-ATP syntázu.³⁹ F1/F0-ATP syntáza je klíčový enzym v procesu oxidativní fosforylace, který využívá kinetickou mechanickou energii usměrněného toku protonů, aby poháněla produkci ATP.^{41, 42}

Během TB meningitidy, když je zanícená hematoencefalická bariéra, dosahuje bedachilin v mozkomíšním moku významných koncentrací. Tyto koncentrace pak významně klesají s obnovou funkce hematoencefalické bariéry. Bedachilin se metabolizuje zejména přes CYP3A4.⁴³ Z toho vyplývá, že pokud by se podával s rifampicinem (významný induktor CYP 3A4) mohlo by dojít k významnému snížení koncentrace bedachilinu v tkáních. K dosažení cílových hodnot je proto nutné zvýšení dávky.^{44,45,46} Protože se bedachilin používá pouze k léčbě MDR-TB, je současné použití těchto léčiv krajně nepravděpodobné. Podávání spolu s inhibitory CYP3A4 vede naopak ke zvýšené expozici, proto je zde vyšší riziko projevu nežádoucích účinků.

Bedachilin se používá pouze v kombinační léčbě u pacientů infikovaných MDR-TB, přičemž pacient musí být vždy starší 18 let. Má doporučenou dávku pro léčbu nemocných trpících MDR-TB 400mg denně perorálně alespoň dva týdny, poté se podává 200 mg 3krát týdně do 24. týdne.⁴⁷

Mezi závažné nežádoucí účinky bedachilinu patří prodloužení QT intervalu. Proto se před zahájením léčby musí provést elektrokardiogram, další vyšetření by mělo nastat ve 2., 12., a 24. týdnu léčby. Dále se během léčby musí monitorovat plazmatické koncentrace sodíku, draslíku a horčíku.⁴⁷

3.5.3.2 Chemoterapeutika odvozená od nitroimidazolů (*delamanid, pretomanid*)



Delamanid

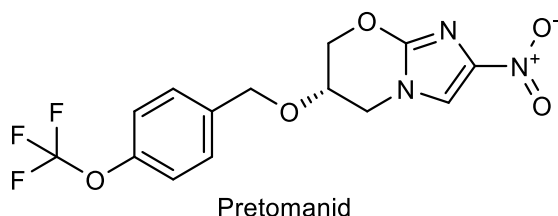
Předpokládaný mechanismus účinku delamanidu je inhibice syntézy methoxymykolových a ketomykolových kyselin, jakožto důležitých komponentů mykobakteriální buněčné stěny.⁴⁸

Delamanid je pro léčivo, u něhož se předpokládá, že musí být aktivováno mykobakteriální F420-dependentní deazaflavin-dependentní nitroreduktázou (Ddn) koenzymovým systémem.⁴⁹

Delamanid se metabolizuje přes CYP3A4, proto je zde stejně jako u bedachilinu velké riziko interakce rifampicinem, který redukuje hladiny delamanidu o 47 %.⁵⁰ Obdobný je i problém s inhibitory enzymu CYP3A4, které naopak mají potenciál zvyšovat riziko nežádoucích účinků delamanidu. To by byl problém v případě léčby pacientů s HIV, kdy některá antivirotika mají významný inhibiční potenciál.

Delamanid se používá pouze v kombinované léčbě dospělých pacientů s MDR-TB. A to v případech, kdy nelze sestavit účinnou léčebnou kombinaci z důvodu rozsahu rezistence nebo tolerance léků. Doporučená denní dávka léku je 100 mg 2krát denně *per os*, alespoň 24 týdnů.⁵¹

Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky delamanidu patří prodloužení QT intervalu, progresivně v prvních 6–10 týdnech léčby. Z toho důvodu je stejně jako u bedachilinu i zde důležité monitorování elektrokardiogramu. Nevýhodou je i slabá účinnost proti extenzivně rezistentním kmenům.⁴⁹



Pretomanid

Pretomanid je dalším zástupcem ze skupiny nitroimidazolových antituberkulotik, který je podobně jako delamanid aktivní proti replikujícím se a nereplikujícím se formám *M. tuberculosis*.^{52, 53}

Pretomanid je stejně jako delamanid pro léčivo, které musí být aktivováno enzymem Ddn. Obě léčiva vykazují také podobný mechanismus účinku. Jeden z aktivních metabolitů pretomanidu je des-nitro derivát, který uvolňuje oxid dusnatý, ten pak poškozují intracelulární proteiny a lipidy buněčné stěny a je tak baktericidní pro anaerobní bakterie. Naopak antituberkulotická aktivita je vysvětlována tím, že pretomanid by mohl inhibovat syntézu mykolových kyselin, speciálně ketomykolové kyseliny.^{54, 55}

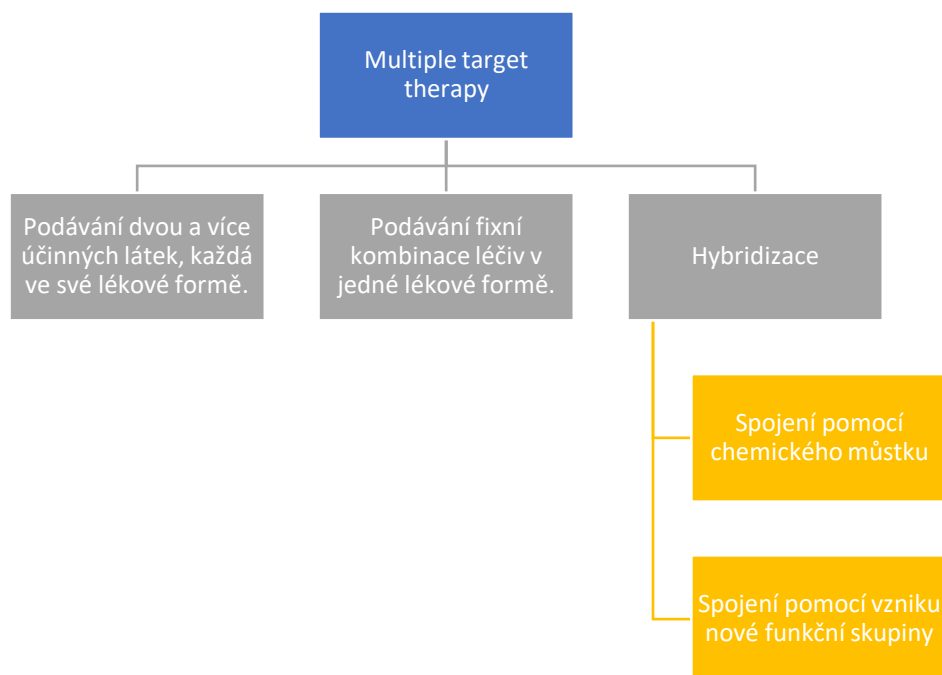
Toto léčivo má oproti delamanidu delší biologický poločas $t_{1/2}$ = 16-20 hodin, a proto se může podávat pouze v jedné denní dávce.⁵⁶

Pretomanid je nově schváleným léčivem Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Je určen pouze pro kombinační léčbu XDR-TB nebo MDR-TB, která nedostatečně odpovídá na předchozí léčbu. Pretomanid se podává pouze v kombinaci s bedachilinem a linezolidem v dávce 200mg/den.⁵⁷

Mezi závažné nežádoucí účinky patří anémie, periferní neuropatie a poruchy rytmu.⁵⁷

3.6 Hybridizace při navrhování nových léčiv

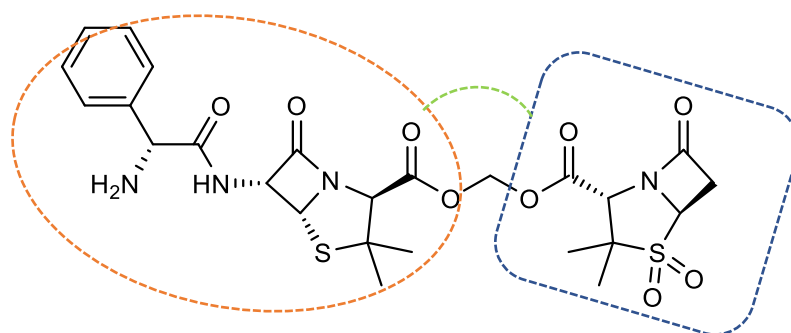
Jak jsme nastínili již v předchozích kapitolách, terapie tuberkulózy je komplexní, dlouhodobá léčba vyžadující podávání hned několika účinných látek s rozdílnými mechanismy účinku. Někdy se tento přístup nazývá také „Multiple target therapy“ (terapie mířící na několik cílů). Multiple target therapy je možno v zásadě rozdělit na tři typy (Obrázek 2). Prvním typem je standartní podávání několika účinných látek, přičemž každá účinná látka má svoji lékovou formu (zjednodušeně: mám užívat kombinaci 4 účinných látek, užívám 4 tabletky). Druhým typem multiple target therapy je podávání fixní kombinace několika účinných látek v jedné lékové formě (dostanu jednu tabletku, která obsahuje všechny účinné látky). Poslední typ multiple target therapy je v oblasti terapie tuberkulózy zatím jen teoretický. Jedná se o přístup, při němž bychom se pokusili zkombinovat několik účinných látek dohromady za účelem vytvoření nové molekulární entity. Takto vzniklá nová molekula by potom mohla díky svým předlohám disponovat několika mechanismy účinku, a tudíž ovlivňovat několik receptorových cílů uvnitř mykobakterie. Tento způsob spojování dvou a více molekul dohromady za účelem vytvoření nové molekulární entity se nazývá hybridizace.



Obrázek 2: Rozdělení multiple target therapy.

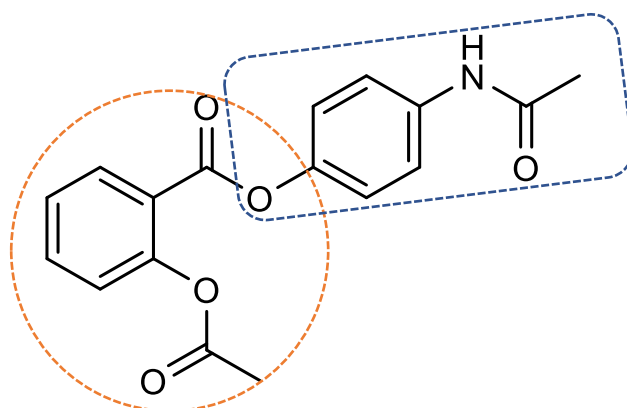
Pokud budeme hovořit o hybridizaci, je pro nás stěžejní otázkou, jak spojit dvě účinné látky (molekuly) dohromady. Odpověď na tuto otázku nám avizuje dvě cesty k hybridizaci, kterými se můžeme vydat. První přístup je, že molekuly spojíme dohromady pomocí něčeho, co bych si dovolil nazvat jako „chemický můstek“. Chemické můstky můžeme z pohledu stability rozdělit na dvě skupiny za a) na štěpitelné, za b) na neštěpitelné. Štěpitelné chemické můstky jsou nestabilní spojovníky dvou a více aktivních molekul, které po vstupu hybridní sloučeniny do organismu se rozštěpí a uvolní původní molekuly, z nichž byla hybridní sloučenina tvořena. Takto vzniklá hybridní sloučenina je ve své podstatě proléčivem. Jako štěpitelné chemické můstky se s oblibou používají nestabilní funkční skupiny, které se po vstupu do organismu snadno štěpí, např. estery, které jsou snadno hydrolyzovatelné díky přítomnosti esteráz v krevní plazmě. Neštěpitelné chemické můstky jsou stabilními spojovníky dvou a více molekul a po vstupu hybridního léčiva do organismu se neštěpí. Jedná se nejčastěji o alkylové řetězce nebo fragmenty arylů, které mohou svými vlastnostmi přispět k aktivitě výsledné molekuly. Nejdůležitější vlastností neštěpitelného chemického můstku je, že nesmí způsobit inaktivaci spojených částí. Přístupu spojení dvou molekul pomocí chemického můstku bylo využito při vývoji léčiva sultamicillinu. Toto léčivo je kombinací dvou molekul, a to aminopenicilinového antibiotika ampicilinu a inhibitoru bakteriálních betalaktamáz sulbaktamu (Obrázek 3). Na obrázku vidíme jasně znázorněnou molekulu sultamicillinu, přičemž v červené

bublině vidíme molekulu ampicilinu a v modré bublině je molekula sulbaktamu. Tyto dvě molekuly jsou spojeny pomocí chemického můstku, kterým je v tomto případě methylenová funkční skupina.



Obrázek 3: Molekula sultamicilinu, v červené bublině ampicilin, v modré sulbaktam, zeleně naznačen methylenový chemický můstek.

Druhý přístup k hybridizaci dvou molekul je jejich spojení pomocí již existujících funkčních skupin, čímž dojde ke vzniku nové funkční skupiny. I v tomto případě můžeme nově vzniklé hybridní sloučeniny rozdělit z pohledu stability na štěpitelné a neštěpitelné. Tohoto přístupu bylo využito při vývoji léčiva benorilátu (Obrázek 4). Na obrázku vidíme, že benorilát je složen z kyseliny acetylsalicylové v červené bublině a paracetamolu v modré bublině. Tyto dvě molekuly jsou spojeny pomocí esterové vazby, která vznikla reakcí karboxylové funkční skupiny v poloze 1 kyseliny acetylsalicylové a fenolické funkční skupiny paracetamolu.

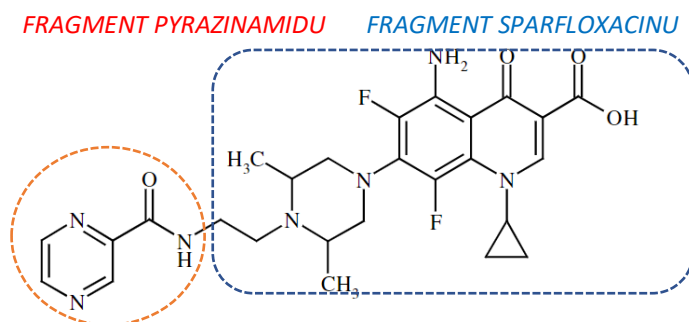


Obrázek 4: Molekula benorilátu – v červené bublině kys. acetylsalicylová, v modré paracetamol, průnik obou bublin tvoří ester vzniklý spojením funkčních skupin.

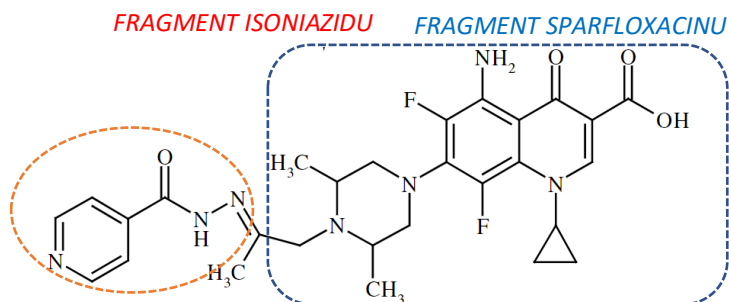
3.7 Příklady hybridizace při navrhování nových antituberkulotik

Snaha najít nové účinné molekuly na léčbu TB vedou mimo jiné k pokusům vytvořit hybridní molekulu. Bohužel zatím žádná z nalezených struktur nedosáhla komerčního významu. Například na Katedře farmaceutické chemie The Bombay College of

Pharmacy v Indii se snažili vytvořit novou hybridní molekulu kombinací fluorochinolonů s pyrazinamidem nebo isoniazidem (Obrázek 5, Obrázek 6).⁵⁸

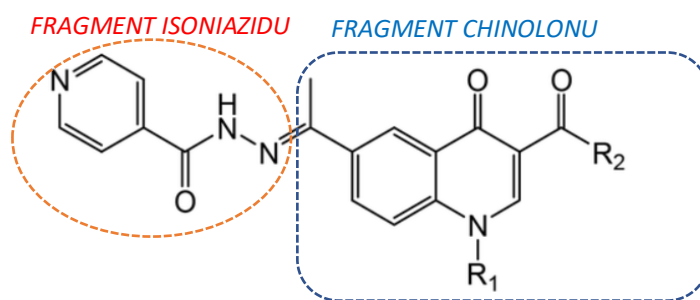


Obrázek 5: Hybridní molekula – fragment pyrazinamidu v červené bublině, fragment sparfloxacinu v modré bublině, propojeny ethylenovým můstkem.



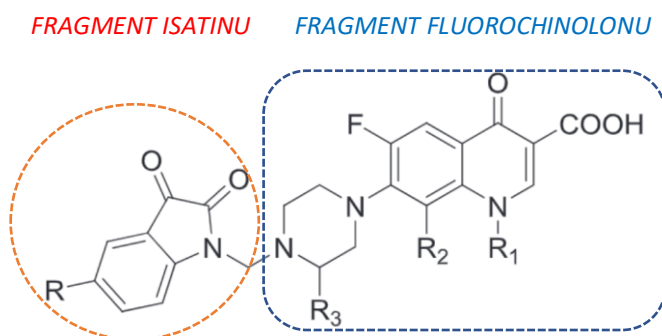
Obrázek 6: Hybridní molekula – fragment isoniazidu v červené bublině, fragment sparfloxacinu v modré bublině, propojeny chemickým můstkem.

Jiná výzkumná skupina pod vedením R. M. Betecka se zabývala do jisté míry podobným tématem. Zkoušeli spojit různé deriváty chinolonů s isoniazidem pomocí hydrazid-hydrazonové vazby a měřili jejich aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* (Obrázek 7).⁵⁹



Obrázek 7: Hybridní molekula – fragment isoniazidu v červené bublině, farmakofor chinolonů v modré bublině.

Další zajímavým pokusem z pohledu použití hybridizace při vývoji nových antituberkulotik byla práce publikovaná pod vedením Zhi Xu. Ta se zabývá syntézou molekul kombinující molekuly fluorchinolonů s deriváty isatinu (Obrázek 8).⁶⁰ Isatin je farmakofor, jehož deriváty mají různou biologickou aktivitu. Využívá se jako základní stavební kámen pro přípravu řady chemoterapeutik a antivirotik.^{61,62}

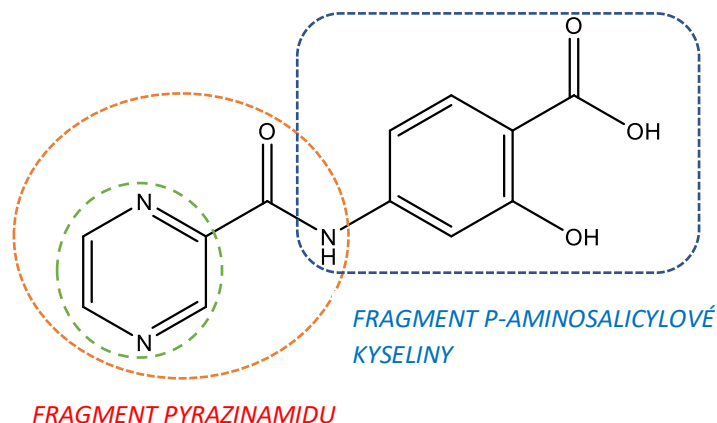


Obrázek 8: Hybridní molekula – fragment isatinu v červené bublině, fragment chinolonu v modré bublině.

3.8 Titulní sloučeniny

V této diplomové práci představujeme syntézu 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido) benzoové kyseliny a jejích 9 derivátů. Během hledání na SciFinder 11. prosince 2019 jsme zjistili, že pouze dvě z těchto deseti sloučenin mají číslo CAS, jednalo se o sloučeniny nesoucí označení BBPS1 a BBPS14. S výjimkou sloučeniny BBPS1 nebyla žádná z připravených sloučenin doposud zmíněna v literatuře. Tato práce je součástí dlouhotrvajícího výzkumu derivátů pyrazinamidu jako potenciálních antituberkulotik, probíhajícího na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (KFCHFA). Tato série se zabývá syntézou hybridních sloučenin kombinujících fragmenty dvou existujících antituberkulotik, pyrazinamidu a *p*-aminosalicylové kyseliny (Obrázek 9).

Tato výchozí struktura byla pak modifikována v oblasti pyrazinového jádra a byl přitom sledován efekt jednotlivých obměn na biologickou aktivitu výsledné sloučeniny.



Obrázek 9: Výchozí struktura, zeleně zvýrazněny sledovaná místa modifikací.

U všech připravených sloučenin byla testována jejich biologická aktivita. Testovala se antimykobakteriální aktivita proti 6 mykobakteriálním kmenům (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium smegmatis*). Dále se testovala antibakteriální aktivita látek proti 8 bakteriálním kmenům (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicilin resistantní, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*). Antifungální aktivita sloučenin se testovala proti 8 kmenům hub (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Trichophyton interdigitale*, *Aspergillus fumigatus*). Sloučeniny byly dále testovány na *in vitro* cytotoxicitu proti buněčné linii lidských jaterních rakovinných buněk HepG2.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie, přístrojové vybavení a analytické metody

Všechny chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) a byly použity v dodané kvalitě.

Nově připravené sloučeniny byly syntetizovány v laboratořích Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (KFCHFA) na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy.

Průběh reakcí byl sledován pomocí metody tenkovrstvé chromatografie. Použity byly TLC desky Merck Silica 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo). Detekce TLC chromatografie probíhala za použití UV lampy při vlnové délce 254 nm. Hodnoty R_f byly vypočítány metodou tenkovrstvé chromatografie, jako mobilní fáze byl použit ethyl-acetát s příměsí 1 % kyseliny chlorovodíkové.

NMR spektra byla naměřena na přístroji Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) při frekvenci 500 MHz pro ¹H spektra a při frekvenci 126 MHz pro ¹³C spektra. Spektra byla měřena v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆). Chemické posuny byly zaznamenány v jednotkách ppm (δ) a jsou nepřímě vztaženy k tetramethylsilanu (TMS). Referenčními signály byly zbytkové signály DMSO (2,49 ppm pro ¹H spektrum a 39,7 ppm pro ¹³C).

Infračervená spektra byla naměřena pomocí FT-IR Nicolet 6700 spektrometru (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). K naměření byla použita metoda zeslabeného vnitřního odrazu (ATR) na germaniovém krystalu.

Elementární analýza byla provedena na analyzátoru MICRO cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo). Všechny naměřené hodnoty elementární analýzy jsou uvedeny v procentech.

Teploty tání byly určeny metodou otevřené kapiláry pomocí bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Naměřené hodnoty nejsou zkorigovány.

Výtěžky reakcí jsou vyjádřeny v procentech jako podíl teoretického výtěžku reakce a izolovaného produktu poté, co prošel všemi čistícími kroky.

Teoretické parametry lipofility log *P* a Clog *P* byly zjištěny pomocí programu ChemDraw Professional, verze 18.1.2.18 (PerkinElmer Informatics, Inc., Waltham, MA, USA). Výsledky hodnot log *P* byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa. Výsledky hodnot Clog *P* zaokrouhlovány nebyly.

Všechny strukturní vzorce, sumární vzorce a výpočty molekulových hmotností byly provedeny v programu ChemDraw Professional, verze 18.1.2.18 (PerkinElmer Informatics, Inc., Waltham, MA, USA).

4.2 Syntéza 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a jejích jednotlivých substituovaných derivátů

K přípravě hybridních sloučenin BBPS1 až BBPS14 byla použita následující metoda syntézy: Výchozími látkami pro syntézu byly různě substituované deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny (nebo obdobné heterocyklické kyseliny) a *para*-aminosalicylová kyselina. Vždy jsme se snažili propojit obě sloučeniny vytvořením nové amidové vazby, přes karboxylovou funkční skupinu v poloze 2 pyrazinového jádra a aminoskupinu v poloze 4 *para*-aminosalicylové kyseliny (Schéma 1).



Schéma 1: Obecné schéma přípravy 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a jejích jednotlivých substituovaných derivátů.

1,1'-Karbonyldiimidazol (CDI) nám při této reakci slouží jako aktivátor, který reakcí s karboxylovou funkční skupinou pyrazin-2-karboxylové kyseliny vytvoří reaktivní meziprodukt (*N*-acylimidazol). Takto aktivovaný meziprodukt při setkání s aminoskupinou *para*-aminosalicylové kyseliny velice ochotně reaguje za tvorby amidové vazby. Reakce mezi karboxylovou funkcí a CDI probíhá mechanismem nukleofilní substituce. Mechanismem nukleofilní substituce dochází k ataku karboxylové funkční skupiny na karboxylový uhlík CDI, následnou kaskádou procesů pak dochází k uvolnění molekuly imidazolu a oxidu uhličitého. Uvolněný oxid uhličitý signalizuje zahájení reakce mezi molekulami derivátu pyrazin-2-karboxylové kyseliny a CDI. Ve chvíli, kdy se přestane uvolňovat oxid uhličitý ve formě bublinek plynu, víme, že všechny molekuly pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly přeměněny na *N*-acylimidazol, a tudíž jsou aktivované (Schéma 2).

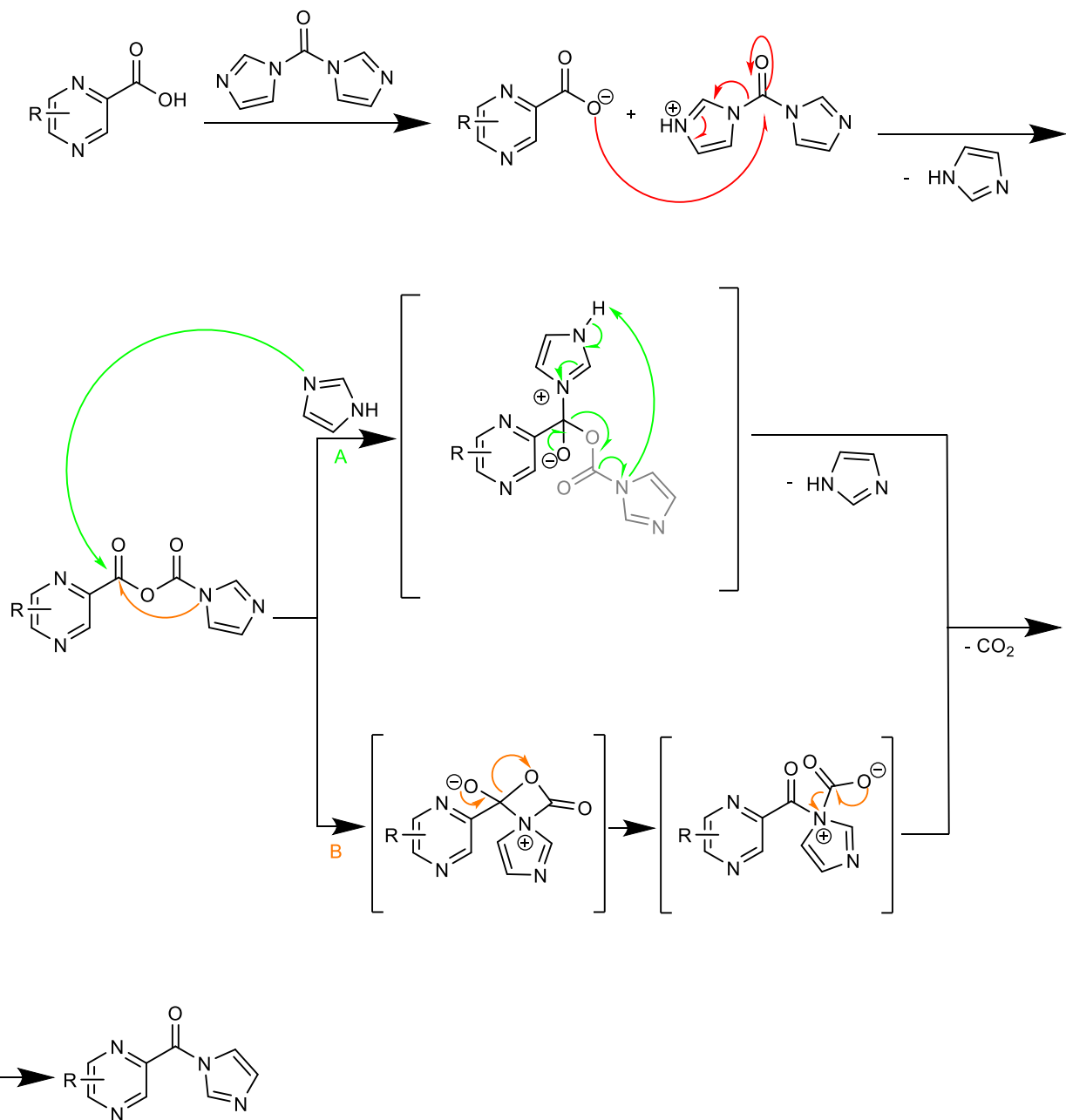


Schéma 2: Mechanismus aktivace karboxylové kyseliny pomocí CDI.

Po aktivaci všech molekul pyrazin-2-karboxylové kyselin přecházíme k druhé části syntézy. Ve druhé části syntézy dochází k reakci *N*-acylimidazolu s aminoskupinou v poloze 4 *para*-aminosalicylové kyseliny za tvorby amidu a uvolnění molekuly imidazolu (Schéma 3).⁶³

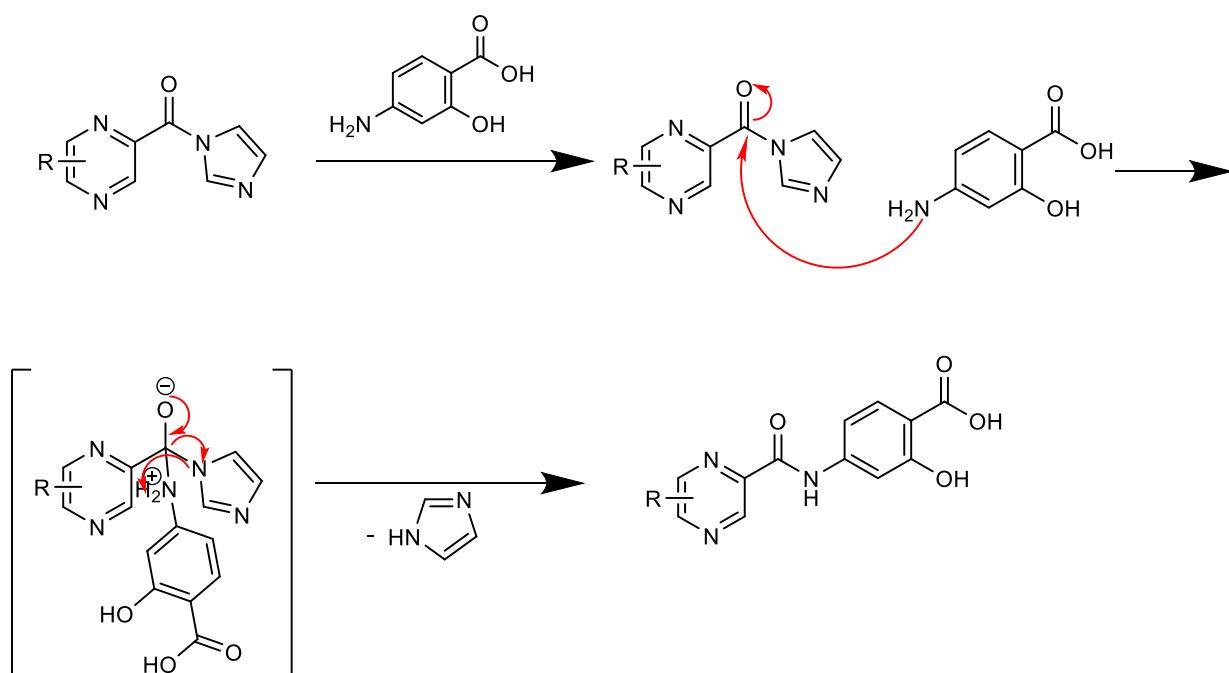


Schéma 3: Předpokládaný mechanismus reakce acylimidazolu s para-aminosalicylovou kyselinou.

Celá syntéza probíhá v prostředí dimethylsulfoxidu (DMSO), který zde má funkci rozpouštědla. Izolace výsledného produktu z roztoku DMSO byla provedena vysrážením přidávkem vody. Naše finální sloučeniny, pokud jsou v neionizovaném stavu, tak jsou jen málo rozpustné ve vodě. Proto přidáním vody a okyselením roztoku pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové (HCl) dochází k jejich precipitaci. Takto vzniklý precipitát pak snadno odfiltrujeme. Okyselení směsi má i druhý význam. Udrží imidazol (vedlejší produkt reakce) ve formě ve vodě dobře rozpustného hydrochloridu, a proto nedochází k jeho precipitaci z roztoku. Roztok DMSO a vody okyselujeme postupně, abychom docílili tvorbu „velkých částic“ precipitátu, který nám nebude pronikat skrze póry filtru.

4.3 Postup přípravy 2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny a jejích jednotlivých substituovaných derivátů

4.3.1 BBPS1

Připravíme si dvě skleněné zkumavky. Do zkumavky č. 1 navážíme 248 mg (2 mmol) pyrazinkarboxylové kyseliny a 357 mg (2,2 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazolu. Směs protřepáním zkumavky důkladně promísíme. Potom zkumavku zahřejeme fénem, vložíme do ní míchadlo a přidáme 2 ml dimethylsulfoxidu. Směs se za stálého míchání začne pomalu rozpouštět a při tom se uvolňuje oxid uhličitý, což je viditelné jako

uvolňování bublinek. Směs necháme reagovat zhruba 30 minut, dokud nedojde k aktivaci všech molekul pyrazinkarboxylové kyseliny. Konec aktivace poznáme podle toho, že směs přestane uvolňovat oxid uhličitý, to znamená, že přestane bublat.

Do zkumavky č. 2 navážíme 306,3 mg (2 mmol) *para*-aminosalicylové kyseliny. Tu rozpustíme přidáním co nejmenšího možného množství dimethylsulfoxidu. Po úplném rozpuštění *para*-aminosalicylové kyseliny převedeme obsah ze zkumavky č. 2 do zkumavky č. 1. Zkumavku č. 1 uzavřeme a necháme za stálého míchání při laboratorní teplotě reagovat do druhého dne.

Druhý den do zkumavky č. 1 přidáme 1 ml vody. Obsah zkumavky se začne mírně zakalovat, pozorujeme i mírnou opalescenci. Poté do směsi postupně přidáváme 5% (m/m) kyselinu chlorovodíkovou a sledujeme změny pH pomocí univerzálního indikátorového papírku. Během přidávání 5% kyseliny chlorovodíkové dochází k postupnému vzniku precipitátu ve směsi. Kyselinu chlorovodíkovou přidáváme až do té doby, dokud pH směsi ve zkumavce nebude mít hodnotu pH 1. Precipitát poté odsajeme na fritě a důkladně promýváme destilovanou vodou, abychom se zbavili zbytků rozpouštědla (v našem případě dimethylsulfoxidu) a do neutrální reakce. Po promytí produkt důkladně zbavíme přebytečné vody stlačením mezi dvěma filtračními papíry a necháme ho vyschnout při teplotě 25 °C do druhého dne.

Příprava dalších derivátů se liší použitými karboxylovými kyselinami a rozdílnými navážkami. Konkrétní navážky výchozích surovin jsou uvedeny v kapitole: Výchozí látky a činidla použité při syntéze.

4.4 Výchozí látky a činidla použité při syntéze

4.4.1 Pyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: C₅H₄N₂O₂

Molekulová hmotnost: 124,10 g/mol

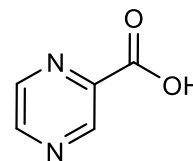
Log *P*: -0,66

CLog*P*: 0,09993

Použito pro přípravu: **BBPS1**

2-hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 248 mg (2 mmol)



4.4.2 3,8a-Dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: C₇H₇N₃O₂

Molekulová hmotnost: 165,15 g/mol

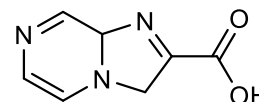
Log *P*: -0,27

CLog*P*: -1,79988

Použito pro přípravu: **BBPS3**

4-(3,8a-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoové kyseliny

Navážka: 326 mg (2mmol)



4.4.3 Chinoxalin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: C₉H₆N₂O₂

Molekulová hmotnost: 174,16 g/mol

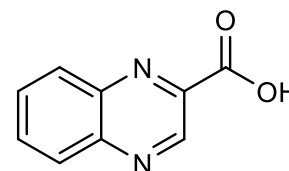
Log *P*: 1,18

CLog*P*: 1,69393

Použito pro přípravu: **BBPS6**

2-hydroxy-4-(chinoxalin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 348 mg (2 mmol)



4.4.4 3-Karbamoylpyrazin-2-karboxylová kyselina

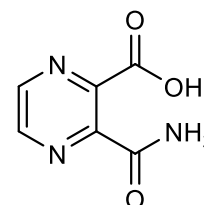
Sumární vzorec: C₆H₅N₃O₃

Molekulová hmotnost: 167,12 g/mol

Log *P*: -1,33

CLog*P*: -1,41682

Použito pro přípravu: **BBPS7**



4-(3-karbamoylpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoové kyseliny

Navážka: 334 mg (2 mmol)

4.4.5 3,5-Dichlorpyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_2Cl_2N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 192,98 g/mol

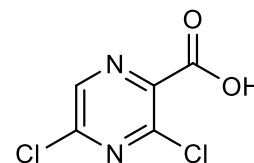
Log *P*: 1,14

CLog*P*: 0,947554

Použito pro přípravu: **BBPS8**

4-(3,5-dichlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoové kyseliny

Navážka: 386 mg (2mmol)



4.4.6 3-Oxo-3,4-dihydropyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_4N_2O_3$

Molekulová hmotnost: 140,10 g/mol

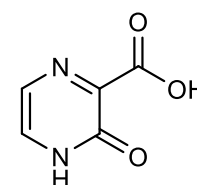
Log *P*: -0,8

CLog*P*: -0,88127

Použito pro přípravu: **BBPS9**

2-hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 280 mg (2mmol)



4.4.7 3-Oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_9H_6N_2O_3$

Molekulová hmotnost: 190,16 g/mol

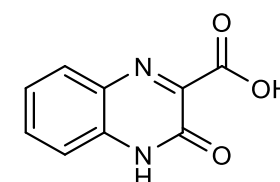
Log *P*: 0,44

CLog*P*: 0,71273

Použito pro přípravu: **BBPS10**

2-hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 380 mg (2mmol)



4.4.8 3-Methylpyrazin-2-karboxylová kyselina

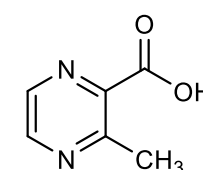
Sumární vzorec: $C_6H_6N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 138,13 g/mol

Log *P*: 0,04

CLog*P*: 0,29893

Použito pro přípravu: **BBPS11**



2-hydroxy-4-(3-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 276 mg (2mmol)

4.4.9 6-Methylpyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_6H_6N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 138,13 g/mol

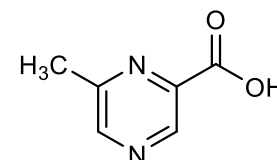
Log *P*: 0,04

CLog*P*: 0,59893

Použito pro přípravu: **BBPS12**

2-hydroxy-4-(6-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoové kyseliny

Navážka: 276 mg (2mmol)



4.4.10 6-Chlorpyrazin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_3ClN_2O_2$

Molekulová hmotnost: 158,54 g/mol

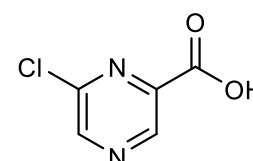
Log *P*: 0,24

CLog*P*: 0,828948

Použito pro přípravu: **BBPS14**

4-(6-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoové kyseliny

Navážka: 317 mg (2mmol)



4.4.11 4-Amino-2-hydroxybenzoová kyselina (*p*-aminosalicylová kys.; PASA)

Sumární vzorec: $C_7H_7NO_3$

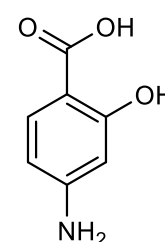
Molekulová hmotnost: 153,14 g/mol

Log *P*: 0,4

CLog*P*: 1,0562

Použito pro přípravu: **Celé série**

Navážka: 306 mg (2 mmol)



4.4.12 1,1'-Karbonyldiimidazol (CDI)

Sumární vzorec: $C_7H_6N_4O$

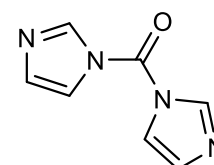
Molekulová hmotnost: 162,15 g/mol

Log *P*: -0,81

CLog*P*: -1,454

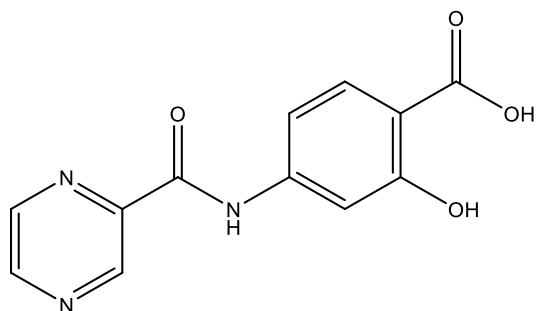
Použito pro přípravu: **Celé série**

Navážka: 356 mg (2,2 mmol)



4.5 Nově připravené látky

4.5.1 2-Hydroxy-4-(pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS1**

Číslo CAS: [95444-50-1](#)

Vzhled: Bílý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₂H₉N₃O₄

Molekulová hmotnost: 259,22 g/mol

Log *P*: -0,24

CLog *P*: 1,5205

R_f = 0,07

Mobilní fáze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 252—253 °C (dle literatury⁶⁴ 268—270 °C)

Teoretický výtěžek: 526 mg

Praktický výtěžek: 481 mg (91 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3324 (fenolový OH), 3088 (amidový NH), 2834 (karboxylový OH), 1669 (karboxylový C=O), 1603, 1541, 1526 (aromatický C-C), 1228 (karboxylový C-O), 906 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.50 (s, 1H, -OH), 10.35 (bs, 1H, -COOH), 10.07 (s, 1H, -CONH-), 9.82 (s, 1H, pyrazin), 9.16 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, pyrazin), 9.08 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, pyrazin), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.34 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický).

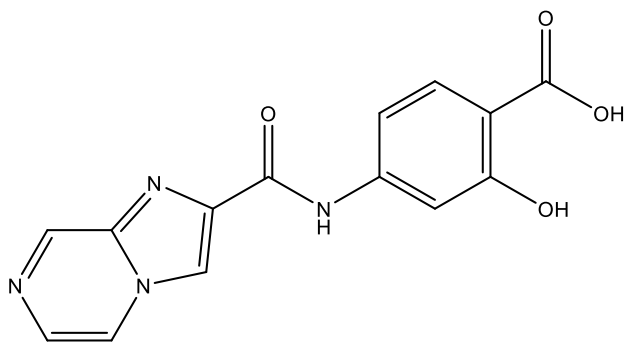
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.65, 165.69, 162.75, 148.76, 147.97, 145.67, 144.84, 143.12, 132.14, 115.13, 113.99, 108.04.

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 55.60 %, H 3.50 %, N 16.21 %

Naměřená: C 55.18 %, H 3.48 %, N 16.45 %

4.5.2 2-Hydroxy-4-(imidazo[1,2-a]pyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS3**

Vzhled: Hnědý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₄H₁₂N₄O₄

Molekulová hmotnost: 298,26 g/mol

Log *P*: -0,05

CLog *P*: 0,13788

R_f = 0,09

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 298—299 °C

Teoretický výtěžek: 606 mg

Praktický výtěžek: 240 mg (40 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3361 (fenolový OH), 3332 (amidový NH), 3131 (karboxylový OH), 1685 (karboxylový C=O), 1598, 1542, 1519 (aromatický C-C), 1184 (karboxylový C-O), 942 (karboxylový OH).

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.81 (bs, 1H, -COOH), 9.23 (s, 1H, -CONH-), 8.72 (s, 1H, pyrazin), 8.67 (d, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 1H, pyrazin), 8.62 (d, *J* = 4.6, 1.6 Hz, 1H, pyrazin), 8.59 (s, 1H, imidazol), 8.00 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, aromatický), 7.87 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H, aromatický).

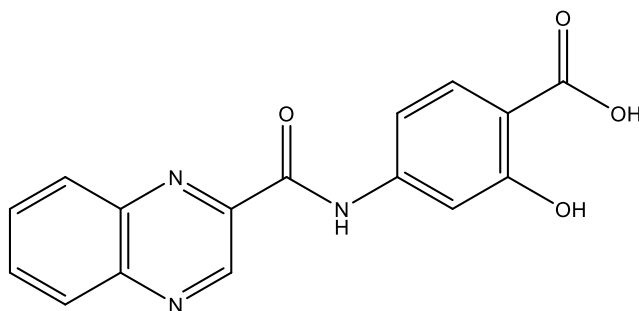
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.90, 164.39, 162.87, 145.13, 144.61, 140.37, 131.29, 130.02, 121.15, 118.90, 117.29, 114.23, 112.39, 107.75.

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 56.38 %, H 3.38 %, N 18.79 %

Naměřená: C 56.17 %, H 3.39 %, N 18.87 %

4.5.3 2-Hydroxy-4-(chinoxalin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS6**

Vzhled: Šedo-žlutý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₆H₁₁N₃O₄

Molekulová hmotnost: 309,28 g/mol

Log *P*: 1,6

CLog *P*: 3,1145

R_f = 0,39

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 259—260 °C

Teoretický výtěžek: 619 mg

Praktický výtěžek: 279 mg (45 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3271 (fenolový OH), 3315 (amidový NH), 3087 (karboxylový OH), 1703 (karboxylový C=O), 1584, 1569, 1505 (aromatický C-C), 1074 (karboxylový C-O), 892 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.67 (s, 1H, -OH), 11.38 (bs, 1H, -COOH), 11.01 (s, 1H, -CONH-), 9.53 (s, 1H, pyrazin), 8.34 – 8.26 (m, 1H, aromatický), 8.25 – 8.15 (m, 1H, aromatický), 8.06 – 7.93 (m, 2H, aromatický), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.69 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.51 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický);

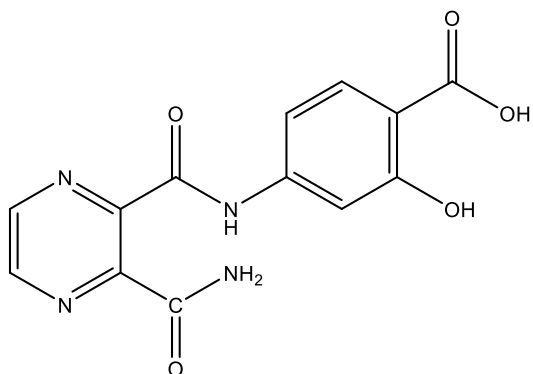
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.73, 164.78, 162.10, 144.69, 144.55, 142.16, 140.18, 131.62, 131.13, 130.19, 129.78, 129.30, 128.32, 114.41, 113.66, 107.60.

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 62.14 %, H 3.59 %, N 13.59 %

Naměřená: C 61.92 %, H 3.61 %, N 13.53 %

4.5.4 4-(3-Karbamoylpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Označení: **BBPS7**

Vzhled: Kanárkově žlutý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀N₄O₅

Molekulová hmotnost: 302,25 g/mol

Log *P*: -0,91

CLog *P*: -0,240092

R_f = 0,05

Mobilní fáze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 282—283 °C

Teoretický výtěžek: 508 mg

Praktický výtěžek: 201 mg (40 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3442 (fenolový OH), 3334 (zejména amino/amidový NH), 3106 (karboxylový OH), 1683 (karboxylový C=O), 1595, 1565, 1538 (aromatický C-C), 1299 (karboxylový C-O), 942 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.61 (s, 1H, -OH), 11.34 (bs, 1H, -COOH), 10.68 (s, 1H, -CONH-), 8.30 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, pyrazin), 7.92 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, pyrazin), 7.88 (s, 2H, -NH₂), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.59 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.42 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický).

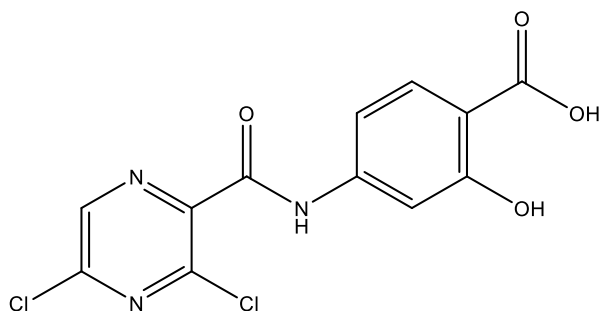
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.65, 171.79, 165.24, 162.11, 155.69, 147.94, 144.79, 141.45, 131.23, 126.96, 114.43, 113.52, 107.29.

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 51.66 %, H 3.34 %, N 18.54 %

Naměřená: C 51.41 %, H 3.68 %, N 18.32 %

4.5.5 4-(3,5-Dichlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Označení: **BBPS8**

Vzhled: Bílý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₂H₇Cl₂N₃O₄

Molekulová hmotnost: 328,11 g/mol

Log *P*: 1,56

CLog *P*: 2,13359

R_f = 0,35

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 237—239 °C

Teoretický výtěžek: 674 mg

Praktický výtěžek: 121 mg (18 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3401 (fenolový OH), 3375 (amidový NH), 3230 (karboxylový OH), 1699 (karboxylový C=O), 1604, 1555, 1517 (aromatický C-C), 1207 (karboxylový C-O), 979 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.38 (bs, 1H, -COOH), 10.03 (s, 1H, -CONH-), 9.50 (s, 1H, pyrazin), 7.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, aromatický), 7.46 (s, 1H, aromatický), 6.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, aromatický).;

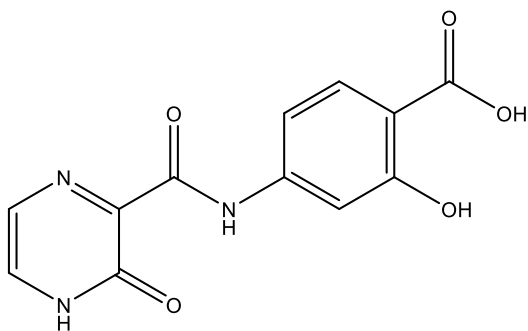
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.87, 164.89, 162.77, 149.43, 146.12, 144.98, 144.23, 143.45, 131.86, 113.52, 112.34, 105.17

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 43.93 %, H 2.15 %, N 12.81 %

Naměřená: C 43.85 %, H 2.14 %, N 12.62 %

4.5.6 2-Hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS9**

Vzhled: Bílý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₂H₉N₃O₅

Molekulová hmotnost: 275,22 g/mol

Log *P*: -0,38

CLog *P*: 0,487499

R_f = 0,06

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 285—287 °C

Teoretický výtěžek: 573 mg

Praktický výtěžek: 418 mg (73 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3566 (fenolový OH), 3545 (amidový NH), 2867 (karboxylový OH), 1703 (C=O), 1660 (karboxylový C=O), 1621, 1587, 1548 (aromatický C-C), 1308 (karboxylový C-O), 920 (karboxylový OH).;

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.57 (bs, 1H, -COOH), 11.38 (s, 1H, -CONH-laktamový), 9.11 (s, 1H, -CONH-), 8.01 (t, 1H, pyrazin), 7.83 (d, 1H, pyrazin), 7.69 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, aromatický), 7.49 (s, 1H, aromatický), 7.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, aromatický).

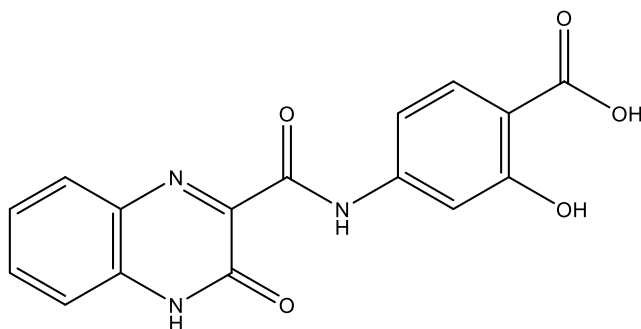
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.65, 164.27, 161.23, 154.47, 146.66, 142.42, 131.40, 127.89, 122.54, 114.41, 113.01, 106.85.

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 52.37 %, H 3.30 %, N 15.27 %

Naměřená: C 51.92 %, H 3.29 %, N 15.62 %

4.5.7 2-Hydroxy-4-(3-oxo-3,4-dihydrochinoxalin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS10**

Vzhled: béžový(šedo-žlutá) pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₆H₁₁N₃O₅

Molekulová hmotnost: 325,28 g/mol

Log *P*: 0,85

CLog *P*: 2,0815

R_f = 0,20

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 290—291 °C

Teoretický výtěžek: 670 mg

Praktický výtěžek: 601 mg (90 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3377 (fenolový OH), 3317 (amidový NH), 3097 (karboxylový OH), 1704 (karboxylový C=O), 1594, 1525, 1497 (aromatický C-C), 1223 (karboxylový C-O), 960 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.72 (s, 1H, -OH), 12.98 (bs, 1H, -COOH), 11.41 (s, 1H, -CONH-), 11.29 (s, 1H, -CONH-), 7.92 – 7.87 (m, 1H, aromatický), 7.79 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, aromatický), 7.71 – 7.62 (m, 1H, aromatický), 7.47 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.43 – 7.35 (m, 2H, aromatický), 7.14 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, aromatický)

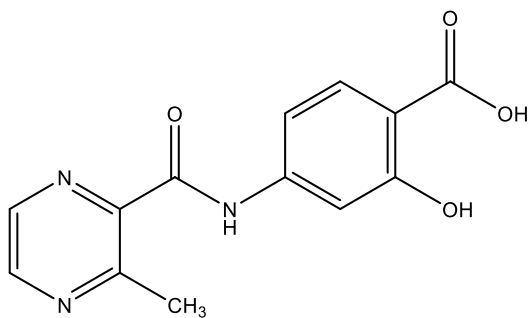
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.67, 162.32, 162.29, 153.88, 151.53, 144.65, 132.78, 132.38, 131.53, 129.55, 125.30, 124.45, 123.96, 114.82, 113.76, 106.72;

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 59.08 %, H 3.41 %, N 12.92 %;

Naměřená: C 58.92 %, H 3.46 %, N 12.62 %

4.5.8 2-Hydroxy-4-(3-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS11**

Vzhled: béžový pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁N₃O₄

Molekulová hmotnost: 273,25 g/mol

Log *P*: 0,46

CLog *P*: 1,6795

R_f = 0,17

Mobilní fáze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 257—258 °C

Teoretický výtěžek: 566 mg

Praktický výtěžek: 524 mg (92 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3396, 3297 (NH₂), 3190 (NH, CONH), 2930 (CH₂), 1670 (CO, CONH)

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.55 (bs, 1H, -COOH), 10.84 (s, 1H, -CONH-), 8.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pyrazin), 7.76 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.55 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.36 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický), 2.76 (s, 3H, -CH₃).;

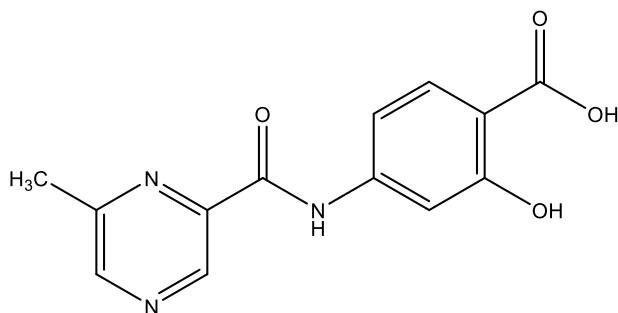
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.69, 164.47, 162.12, 153.45, 146.08, 144.96, 140.93, 134.43, 131.12, 114.43, 113.20, 107.09, 22.61.;

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 57.14 %, H 4.06 %, N 15.38 %

Naměřená: C 57.42 %, H 3.96 %, N 15.62 %

4.5.9 2-Hydroxy-4-(6-methylpyrazin-2-karboxamido)benzoová kyselina



Označení: **BBPS12**

Vzhled: bílý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁N₃O₄

Molekulová hmotnost: 273,25 g/mol

Log *P*: 0,46

CLog *P*: 2,0195

R_f = 0,17

Mobilní faze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 258—260 °C

Teoretický výtěžek: 549 mg

Praktický výtěžek: 448 mg (82 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3333 (fenolový OH), 3123 (amidový NH), 2853 (karboxylový OH), 1674 (karboxylový C=O), 1623, 1598, 1525 (aromatický C-C), 1230 (karboxylový C-O), 943 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.63 (s, 1H, -OH), 11.48 (bs, 1H, -COOH), 10.68 (s, 1H, -CONH-), 9.07 (s, 1H, pyrazin), 8.81 (s, 1H, pyrazin), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.62 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.44 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický), 2.65 (s, 3H, -CH₃);

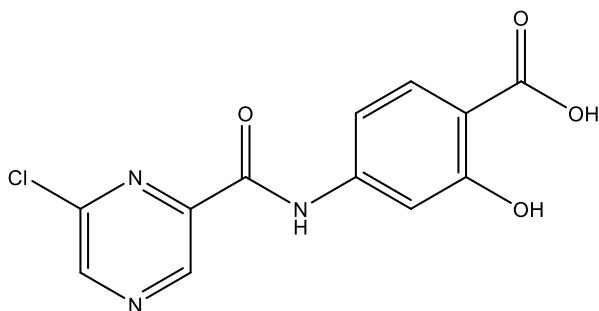
¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.73, 162.62, 162.09, 152.80, 147.96, 144.56, 143.83, 141.15, 131.07, 114.60, 113.79, 107.53, 21.15.;

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 57.14 %, H 4.06 %, N 15.38 %

Naměřená: C 57.45 %, H 4.01 %, N 15.26 %

4.5.10 4-(6-Chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina



Označení: **BBPS14**

Číslo CAS: [1927630-75-8](#)

Vzhled: Světle hnědý pevný prášek

Sumární vzorec: C₁₂H₈ClN₃O₄

Molekulová hmotnost: 293,66 g/mol

Log *P*: 0,66

CLog *P*: 2,24616

R_f = 0,19

Mobilní fáze: EtOAc s 1 % (v/v) HCl

Teplota tání: 241–243 °C

Teoretický výtěžek: 602 mg

Praktický výtěžek: 405 mg (67 %)

IR spektrum (ATR-Ge, cm⁻¹): 3587 (fenolový OH), 3302 (amidový NH), 3054 (karboxylový OH), 1650 (karboxylový C=O), 1621, 1593, 1516 (aromatický C-C), 1303 (karboxylový C-O), 922 (karboxylový OH);

¹H NMR: (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13.70 (s, 1H, -OH), 11.35 (bs, 1H, -COOH), 10.82 (s, 1H, -CONH-), 9.22 (s, 1H, pyrazin), 9.06 (s, 1H, pyrazin), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, aromatický), 7.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, aromatický), 7.44 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, aromatický).;

¹³C NMR: (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.70, 164.99, 161.43, 147.86, 147.07, 145.00, 144.48, 142.70, 131.04, 114.83, 113.98, 107.86.;

Elementární analýza:

Vypočítaná: C 49.08 %, H 2.75 %, N 14.31 %

Naměřená: C 48.98 %, H 2.86 %, N 14.08 %

Naměřená *: C 49.10 %, H 2.69 %, N 14.37 %

* Strukturálně identický produkt později znovu připraven mou konzultantkou MSc. Ghadou Bouz za účelem pokročilých studií.

4.6 Biologické testování látek

4.6.1 Antimykobakteriální aktivita

Nově připravené látky byly podrobeny *in vitro* testům na účinnost proti pěti různým kmenům mykobakterií. Testy antimykobakteriální aktivity byly provedeny na Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové (ÚKM, FNHK) MUDr. Pavlou Paterovou. Testy antimykobakteriální účinnosti proti *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra byly provedeny v laboratořích Katedry lékařských a biologických věd (KBLV) Farmaceutické fakulty (Univerzita Karlova) PharmDr. Ondřejem Jand'ourkem, Ph.D.

4.6.1.1 Antimykobakteriální aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* (ÚKM, FNHK)

Testované kmeny *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294), *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (ATCC 12478) a *M. avium ssp. avium* CNCTC My 80/72 (ATCC 15769) byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika. Ke kultivaci bylo použito médium Middlebrook 7H9 o deklarovaném pH = 6,6 (Sigma-Aldrich) obohacené 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich) a 10% roztokem růstového doplňku OADC (olejová kyselina, albumin, dextróza, kataláza; Himedia, Mumbai, Indie). Testované sloučeniny byly rozpuštěny, následně rozředěny v DMSO a smíseny s živnou půdou (25 μ l roztoku DMSO v 4,475 ml kultivačního media). Poté byly umístěny (100 μ l) do mikrotitračních jamek. Mykobakteriální inokula byla suspendována v růstovém médiu a jeho hustota byla upravena na 0,5-1,0 podle McFarlandovy stupnice. Tyto suspenze byly zředěny 10:1 a následně se použily k inokulaci testovacích jamek, přidáním 100 μ l mykobakteriální suspenze do každé jamky. Výsledná koncentrace testovaných sloučenin v jamkách byla 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13 a 1,56 μ g/ml. Jako pozitivní kontrola byl použit isoniazid (INH), který způsobil inhibici růstu. Negativní kontrola (viditelný růst) se skládala z kultivačního media, mykobakteriální suspenze a DMSO. Po pěti dnech inkubace bylo přidáno celkem 30 μ l Alamar Blue (1:1 směs 0,01% sodné soli resazurinu (vodný roztok) a 10% roztoku Tweenu80). Po 24 hodinách byly stanoveny výsledky inkubace. Minimální inhibiční koncentrace (MIC v μ g/ml) byla stanovena jako nejnižší koncentrace testované sloučeniny, která zabrání změně barvy z modré na růžovou. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech.

4.6.1.2 Antimykobakteriální aktivita proti *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium aurum* a *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* (KBLV)

Další antimykobakteriální testy byly provedeny na rychle rostoucích kmenech *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366) z německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo) a na avirulentním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) z belgické Co-ordinated Collections of Microorganisms. Pro určení aktivity se použila mikrodiluční bujonová metoda s použitím 96 jamkové mikrotitrační destičky. Jako kultivační medium byl použit Middlebrook 7H9 bujón (Sigma-Aldrich) obohacený 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich) a 10% roztokem růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie). Jednotlivé mykobakteriální kmeny byly kultivovány na agaru Middlebrook 7H10 a mykobakteriální suspenze byla připravena v médiu Middlebrook 7H9. Hustota suspenze byla upravena na 0,5-1,0 podle McFarlandovy stupnice a zředěna v poměru 1:20 se živnou půdou (bujón). Testované sloučeniny jsme rozpustili v DMSO (Sigma-Aldrich), poté jsme přidali živnou půdu Middlebrook, abychom získali základní koncentraci 2000 µg/ml. Jako standardy pro určení aktivity testovaných sloučenin jsme použili isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich). Finální koncentrace byly získány binárním ředěním a přidavkem mykobakteriální suspenze. Finální koncentrace testovaných sloučenin byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 µg/ml. Finální koncentrace rifampicinu byly 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 a 0,098 µg/ml. Finální koncentrace ciprofloxacinu byly 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313; 0,0156; 0,0078 µg/ml. Celková koncentrace DMSO nepřekročila 2,5 % (v/v), a neovlivnila růst testovaných kmenů. Do testu byly zahrnuty pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) i negativní (bujón, DMSO) kontrola. Destičky byly uzavřeny pomocí adhezivní polyesterové fólie a nechaly se inkubovat ve tmě při teplotě 37 °C. Po 48 hodinách inkubace (*M. smegmatis*) nebo 72 hodinách inkubace (*M. aurum*) nebo 120 hodinách inkubace (*M. tuberculosis* H37Ra) provedeme barvení. Barvení provádíme pomocí 0,01% roztoku sodné soli resazurinu. Ten byl připraven rozpuštěním sodné soli resazurinu (Sigma-Aldrich) v deionizované vodě za vzniku 0,02% roztoku. Potom byl připraven 10% vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich). Oba roztoky byly smíchány dohromady v poměru 1:1 a přefiltrovány přes membránový bakteriální filtr. Po přidání indikátoru se mikrotitrační destičky nechaly inkubovat další 2,5 hodiny pro zjištění

aktivity proti *M. smegmatis*, 4 hodiny pro zjištění aktivity proti *M. aurum* a 24 hodin pro zjištění aktivity proti *M. tuberculosis* H37Ra.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena pomocí MIC a hodnota byla odečtena na základě zabarvení, přičemž modrá barva značila žádný růst mykobakterie. To znamená, že testovaná sloučenina v dané koncentraci vykazovala určitou aktivitu proti mykobakterii. Růžová barva značila růst mykobakterie, takže testovaná sloučenina v dané koncentraci nevykazovala žádnou aktivitu proti mykobakterii. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech.

4.6.2 Antibakteriální aktivita

Nově připravené látky byly podrobeny *in vitro* testům na účinnost proti vybraným bakteriálním kmenům. Tyto testy probíhaly na Katedře biologických a lékařských věd (KBLV) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením RNDr. Kláry Konečné, Ph.D. a Idy Dufkové.

Antibakteriální aktivita testovaných látek byla zjišťována pomocí mikrodiluční bujonové metody. Látky byly testovány na kmenech bakterií z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Czech Republic) - *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* methicilin resistantní CCM 4750 (ATCC 43300), *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (ATCC 29212), *Escherichia coli* CCM 3954 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853). Dále byly testovány na klinických izolátech z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové, Česká republika – *Staphylococcus epidermidis* 112-2016, *Klebsiella pneumoniae* 64-2016, *Serratia marcescens* 62-2016. Všechny kmeny bakterií byly kultivovány na agaru Mueller-Hinton (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) při teplotě 35 °C a udržovány na stejném mediu při teplotě 4°C. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO, antibakteriální aktivita byla určena v kationem upraveném kapalném bujonu Mueller-Hinton (Difco/Becton Dickinson) puffrovaném na pH 7,0. Pozitivní kontrola se skládala pouze z testu mikroba, zatímco negativní kontrola se skládala z kultivačního media a DMSO. Celková koncentrace DMSO v testovaném mediu nepřekročila 1 % (v/v) z celkového složení roztoku. MIC byla určena po 24 a 48 hodinách statické inkubace při 35 °C vizuálně za pomoci barviva Alamar Blue. Jako standardy byly použity gentamicin a ciprofloxacin. Antibakteriální aktivita gentamicinu byla [MIC proti *Staphylococcus aureus* 1 µg/ml (48 h); *Staphylococcus aureus*

methicillin resistantní 16–32 µg/ml (48 h); *Enterococcus faecalis* 8 µg/ml (48 h); *Escherichia coli* 1–2 µg/ml (48 h); *Pseudomonas aeruginosa* 0.5 µg/ml (48 h); *Staphylococcus epidermidis* >8 µg/ml (48 h); *Klebsiella pneumonia* >8 µg/ml (48 h); *Serratia marcescens* 2 µg/ml (48 h)]. Antibakteriální aktivita ciprofloxacinu byla [MIC proti *Staphylococcus aureus* 0,128–0,256 µg/ml (48 h); *Staphylococcus aureus* methicillin resistant 0,128 µg/ml (48 h); *Enterococcus faecalis* 0,512 µg/ml (48 h); *Escherichia coli* 0,008 µg/ml (48 h); *Pseudomonas aeruginosa* 0,128 µg/ml (48 h); *Staphylococcus epidermidis* >1,024 µg/ml (48 h); *Klebsiella pneumonia* >1,024 µg/ml (48 h); *Serratia marcescens* 0,256 µg/ml (48 h)]. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech. Aby byl výsledek validní, nesmí být rozdíl MIC jedné sloučeniny určený ze dvou paralelních měření větší než jeden krok v ředící škále.

4.6.3 Antifungální aktivita

In vitro testy antifungální aktivity nově připravených látek probíhaly na Katedře biologických a lékařských věd (KBLV) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové pod vedením RNDr. Kláry Konečné, Ph.D. a Idy Dufkové.

Antifungální aktivita testovaných látek byla určována pomocí mikrodiluční bujonové metody. Látky byly testovány na kmenech hub z České sbírky mikroorganismů (CCM) - *Candida albicans* CCM 8320 (ATCC 24433), *C. krusei* CCM 8271 (ATCC 6258), *C. parapsilosis* CCM 8260 (ATCC 22019), *C. tropicalis* CCM 8264 (ATCC 750), *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Lichtheimia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* CCM 8377 (ATCC 9533); nebo z Americké sbírky kultur (American Type Collection Cultures) (ATCC, Manassas, VA, USA) - *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305. Nově připravené sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a zředěny s médiem RPMI 1640, s glutaminem a 2 % glukózy. Směs byla pufrována na pH 7,0 pomocí MOPS (3-morfolinopropan-1-sulfonová kyselina). Celková koncentrace DMSO v testovaném mediu nepřekročila 1 % (v/v) z celkového složení roztoku. Statická inkubace byla prováděna ve tmě, v humidní atmosféře, při 35 °C po dobu 24 a 48 hodin (72 a 120 hodin pro *Trichophyton interdigitale*). Pozitivní kontrola se skládala pouze z testu mikroba, zatímco negativní kontrola se skládala z kultivačního media a DMSO. MIC se kontrolovalo vizuálně s použitím indikátoru Alamar Blue. Jako standardy byly použity amfotericin B [MIC proti *Candida albicans* 0,5 µg/ml (48 h); *C. krusei* 1 µg/ml (48 h); *C. parapsilosis* 0,5 µg/ml (48 h); *C. tropicalis* 1 µg/ml (48 h); *Aspergillus flavus* 8 µg/ml (48 h); *Lichtheimia corymbifera* 0,5 µg/ml (48 h); *Trichophyton interdigitale* 2

$\mu\text{g/ml}$ (72 h); *Aspergillus fumigatus* 1 $\mu\text{g/ml}$ (48 h)] a vorikonazol [MIC proti *Candida albicans* >16 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *C. krusei* 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *C. parapsilosis* 8 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *C. tropicalis* >16 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *Aspergillus flavus* >16 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *Lichtheimia corymbifera* >16 $\mu\text{g/ml}$ (48 h); *Trichophyton interdigitale* >16 $\mu\text{g/ml}$ (72 h); *Aspergillus fumigatus* 1 $\mu\text{g/ml}$ (48 h)]. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech. Aby byl výsledek validní, nesmí být rozdíl MIC jedné sloučeniny určený ze dvou paralelních měření větší než jeden krok v ředící škále.

4.6.4 *In vitro* cytotoxicita

Buněčná linie lidských jaterních rakovinných buněk HepG2, pořízená z Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK), byla kultivována v médiu Minimum Essential Eagle Medium MEM (Sigma-Aldrich) doplněném 10 % fetálním hovězím sérem (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 2 mM roztoku L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a 1 % roztokem neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich), v humidní atmosféře obsahující 5 % CO₂ při 37 °C. HepG2 buňky byly naočkovány o hustotě 1x10⁴ buněk na jamku na 96 jamkovou mikrotitrační destičku. Následující den (24 hodin po naočkování) byly k HepG2 buňkám přidány testované látky, které jsme rozpustili v DMSO (maximální výsledná koncentrace DMSO byla 1 %). Testované látky byly naředěny podle své rozpustnosti v DMSO na koncentrace 1—1000 μM . Po dobu 24 hodin byly experimentální skupiny HepG2 buněk podrobeny působení testovaných látek v humidní atmosféře obsahující 5 % CO₂ při 37 °C, v triplicátech. Zároveň byla připravena kontrola pro stanovení 100% životaschopnosti buněk, kontrola pro stanovení 0% životaschopnosti buněk (buňky byly podrobeny působení 10% roztoku DMSO). Kontroly byly inkubovány simultánně v triplicátech. Na základě doporučení výrobce bylo po 24hodinové expozici přidáno činidlo ze soupravy CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA). Po 2 hodinách inkubace v humidní atmosféře s 5 % CO₂ při 37 °C byla zaznamenána absorbance při vlnové délce 490 nm. Inhibiční křivky byly sestaveny pro každou sloučeninu. Standardní toxikologický parametr IC₅₀ byl vypočítán nelineární regresní analýzou inhibičních křivek pomocí programu GraphPad Prism software (version 7, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5 Výsledky a diskuse

Nově připravené látky byly syntetizovány reakcí příslušného derivátu pyrazin-2-karboxylové kyseliny (nebo obdobné heterocyklické kyseliny) s *p*-aminosalicylovou kyselinou za pomoci činidla CDI. Celá reakce probíhala v prostředí DMSO při 25°C.

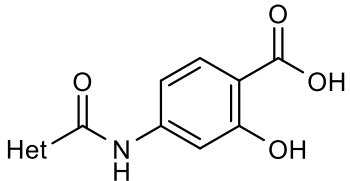
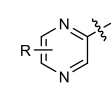
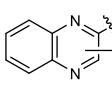
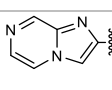
Praktické výtěžky nově připravených látek se pohybovaly v rozmezí od 18 % do 92 % teoretického výtěžku.

U všech nově připravených sloučenin byly stanoveny ¹H, ¹³C NMR spektra, IR spektra a elementární analýza za účelem prokázání vyžadované identity sloučenin. Dále byla u všech sloučenin, pomocí bodotávku, určena teplota tání (tt). Nově připravené sloučeniny jsou zpravidla bílé nebo žluté prášky pevného skupenství.

Teoretické parametry lipofility Log *P* a CLog *P* byly zjištěny pomocí programu ChemDraw Professional, verze 18.1.2.18. Hodnoty Log *P* připravených sloučenin se pohybovaly od -0,91 do 1,6. Hodnoty CLog *P* připravených sloučenin se pohybovaly od -0,240092 do 3,1145.

Všechny nově připravené sloučeniny byly podrobeny testům na zjištění antimykobakteriální aktivity proti vybraným kmenům mykobakterií. Výsledky testů jsou uvedeny v tabulce 3.

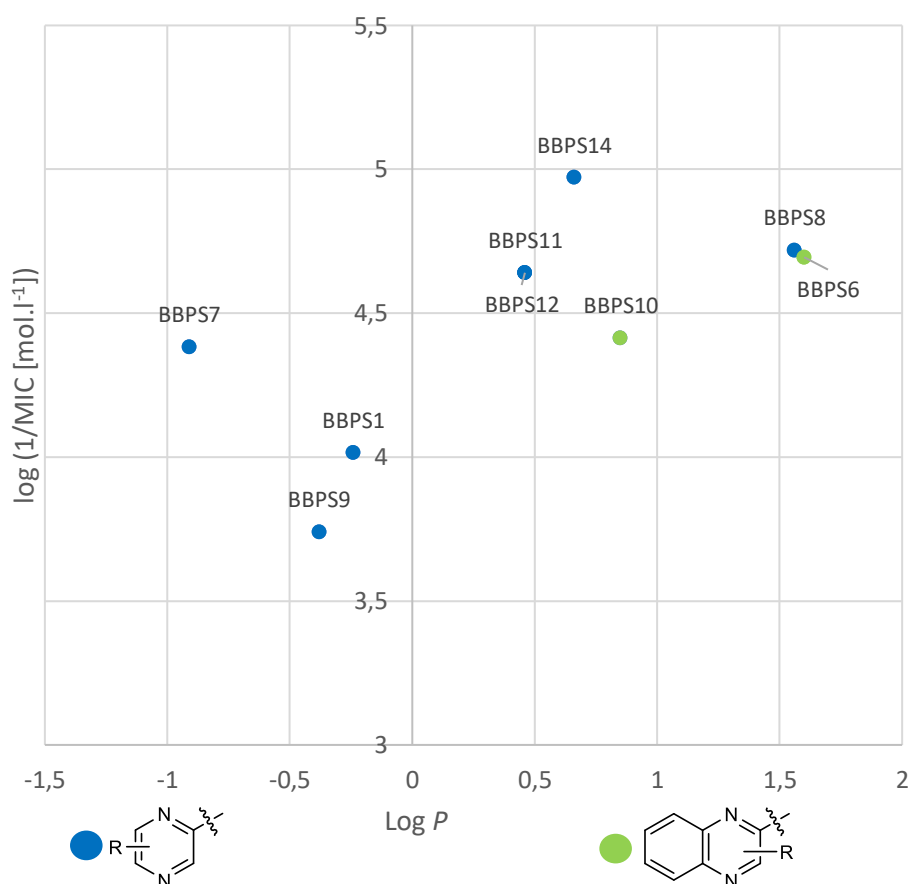
Tabulka 3: Výsledky antimykobakteriálního testování

									IC ₅₀ [μmol.l ⁻¹]
Testované sloučeniny			MIC [μg.ml ⁻¹]						
KÓD	Het	R	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>Mtb</i> H37Ra	<i>M.</i> <i>kans.</i>	<i>M.</i> <i>avium</i>	<i>M.</i> <i>aurum</i>	<i>M.</i> <i>smeg.</i>	HepG2
BBPS1		H	25	62.5	12.5	>100	≥250	≥250	>500**
BBPS11		3-CH ₃	6.25	3.91	12.5	>100	125	≥250	>1000
BBPS12		6- CH ₃	6.25	3.91	6.25	>100	250	≥500	>1000
BBPS7		3-CONH ₂	12.5	62.5	12.5	100	31.25	250	>1000
BBPS9		3-oxo	50	125	100	>100	250	≥500	>500**
BBPS14		6-Cl	3.13	1.98	3.13	100	62.5	250	>1000
BBPS8		3,5-diCl	6.25	3.91	6.25	100	250	≥500	>1000
BBPS6		H	6.25	3.91	12.5	>50	250	≥500	>1000
BBPS10		3-oxo	12.5	15.625	25	>100	125	≥250	>1000
BBPS3		-	>100	250	12.5	>100	≥500	≥500	>1000
PZA*			>100	≥500	>100	>100	≥500	≥500	>10 ⁴ [65]
INH			0.2	0.25	25	12.5	3.91	15.625	79×10 ³ [65]
RIF			n.t.	0.0078	0.025	0.025	1.56	25	n.t.
CPX			n.t.	0.25	0.25	0.125	0.008	0.125	n.t.
PASA			12.5	< 3.91	125	62.5	≥500	≥500	n.t.

*Hodnoty MIC testované při pH = 5.6 (kyselé) jsou 6.25–12.5 μg/mL.⁶⁶ Hodnoty uvedené v tabulce byly stanoveny při pH = 6.6 (neutrální). ** Měření při vyšší koncentraci nebylo možné z důvodu precipitace testované sloučeniny v kultivačním médiu. n.t. – netestováno (not tested).

Na výsledcích uvedených v tabulce vidíme, že většina syntetizovaných sloučenin prokázala dobrou antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv a

M. tuberculosis H37Ra. Můžeme si také povšimnout, že jednotlivé sloučeniny vykazovaly srovnatelnou aktivitu proti oběma kmenům. To znamená, že pokud byly aktivní proti *M. tuberculosis* H37Rv, tak byly aktivní i proti *M. tuberculosis* H37Ra. Dále si můžeme všimnout, že deriváty substituované lipofilními substituenty (-Cl, -CH₃) v oblasti pyrazinového jádra měly vyšší aktivitu oproti derivátům substituovaným hydrofilními substituenty (-CONH₂, -oxo). Tento trend je patrný na grafu (Obrázek 10).



Obrázek 10: Graf závislosti antimykobakteriální aktivity (*M. tuberculosis* H37Rv) na vypočítané lipofilitě Log P hybridních sloučenin. Modrý bod znázorňuje sloučeniny s pyrazinovým heterocyklem, zelený bod sloučeniny s chinoxalinovým heterocyklem. Pozn. Sloučenina BBPS3 nebyla zařazena do následujícího grafu, protože nemá aktivitu proti zmíněnému kmeni.

Tento jev může být vysvětlen tím, že lipofilnější sloučenina snáze projde přes velice lipofilní buněčnou stěnu mykobakterií tvořenou převážně mykolovými kyselinami, nebo tím, že při vazbě na cílový receptor nasedá pyrazinové jádro do určité lipofilní kavity. Zajímavým zjištěním je ovšem fakt, že sloučenina BBPS8 ($MIC_{MtbH37Rv} = 6.25 \mu\text{g.ml}^{-1}$; $MIC_{MtbH37Ra} = 3.91 \mu\text{g.ml}^{-1}$) substituovaná dvěma lipofilními substituenty (3,5-diCl) v polohách 3 a 5 pyrazinového jádra má nižší aktivitu

než sloučenina BBPS14 ($MIC_{MtbH37Rv} = 3.13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $MIC_{MtbH37Ra} = 1.98 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) substituovaná pouze jedním lipofilním (6-Cl) substituentem v poloze 6 pyrazinového jádra. Tento jev by mohl být vysvětlen tím, že při vazbě našich sloučenin na cílový receptor může v poloze 3 pyrazinového jádra docházet ke sterickému bránění. Můžeme také namítat, že rozdíl aktivit je o pouhý jeden stupeň na ředící škále, a tak se může jednat o chybu měření. Nicméně je potřeba si všimnout konzistence výsledků a že stejný trend je patrný i u zbylých kmenů vůči kterým sloučeniny vykazovaly aktivitu. Pokud porovnáme sloučeniny BBPS1 s BBPS6 a sloučeniny BBPS9 s BBPS10 zjistíme že kondenzace benzenového kruhu k pyrazinovému jádru (chinoxalin) má pozitivní vliv na antimykobakteriální aktivitu. Sloučeniny aktivní proti *M. tuberculosis* H37Rv a *M. tuberculosis* H37Ra prokázaly i aktivitu proti *M. kansasii*. Srovnáme-li aktivitu sloučeniny BBPS3 s ostatními sloučeninami ze série, můžeme u BBPS3 pozorovat ztrátu mykobakteriální aktivity s výjimkou aktivity proti *M. kansasii*. Lze tak předpokládat, že fragment pyrazinového jádra bude nezbytným pro zachování aktivity sloučenin. Sloučeniny s označením BBPS7, BBPS10, BBPS11 a BBPS14 vykazovaly slabou aktivitu proti *M. aurum*. Žádná ze syntetizovaných sloučenin neprokázala aktivitu proti *M. smegmatis* nebo *M. avium*.

Nově připravené sloučeniny byly dále podrobeny testům na antibakteriální aktivitu, antifungální aktivitu, a nakonec testům na zjištění jejich *in vitro* cytotoxicity. Žádná z nově připravených sloučenin nevykazovala ve stanovených koncentracích aktivitu vůči bakteriím, plísním a houbám. Maximální koncentrace testovaných sloučenin v jamkách mikrotitrační destičky činila $500 \mu\text{g}/\text{ml}$. Žádná z testovaných látek nevykazovala ve stanovených koncentracích cytotoxicitu (Tabulka 3). Maximální koncentrace testovaných sloučenin v jamkách mikrotitrační destičky byly $500 \mu\text{M}$ u sloučenin s označením BBPS1, BBPS9 (testování při vyšších koncentracích nebylo možné z důvodu jejich nízké rozpustnosti). Maximální koncentrace zbylých testovaných sloučenin byly $1000 \mu\text{M}$. Výsledky biologického hodnocení nám ukazují, že nově připravené sloučeniny vykazují selektivitu působení proti mykobakteriím.

Jako nejvýhodnější se ukázala substituce pyrazinového jádra v poloze 6 chlorem. Sloučenina nesoucí označení BBPS14, tedy 4-(6-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina, vykazovala nejvyšší antimykobakteriální aktivitu se širokým spektrem působení. Hodnoty MIC této sloučeniny byly proti *M. tuberculosis* H37Rv $3,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, *M. tuberculosis* H37Ra $1,98 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, *M. kansasii* $3,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

6 Závěr

Celkem bylo připraveno deset hybridních sloučenin, kombinujících ve své struktuře fragmenty dvou používaných antituberkulotik, a to pyrazinamidu a *p*-aminosalicylové kyseliny. Z těchto deseti hybridních sloučenin měly pouze sloučeniny s označením BBPS1 a BBPS14 uvedené číslo CAS. S výjimkou sloučeniny BBPS1 nebyla žádná z připravených sloučenin doposud zmíněna v literatuře (SciFinder 11. prosince 2019). Připravené sloučeniny jsme podrobili testům na zjištění jejich antimykobakteriální aktivity proti *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra a čtyřem dalším kmenům. Spolu s těmito testy byly připravené sloučeniny podrobeny testům na zjištění antibakteriální, antifungální aktivity a *in vitro* cytotoxicity proti buněčné linii HepG2 rakovinných buněk. Na základě získaných biologických výsledků předpokládáme, že lipofilní substituce v oblasti pyrazinového jádra je žádoucí obměnou pro zvýšení antimykobakteriální aktivity. Sloučeniny s kondenzovaným benzenovým kruhem k pyrazinovému jádru (chinoxalin) vykazovaly vyšší antimykobakteriální aktivitu. Jako nejvýhodnější se ukázala substituce pyrazinového jádra v poloze šest chlorem. Nejaktivnější hybridní sloučenina nesla označení BBPS14 (R = 6-Cl). Tato sloučenina vykazovala široké spektrum aktivity proti mykobakteriím. Hodnoty MIC této sloučeniny byly proti *M. tuberculosis* H37Rv 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (10,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), *M. tuberculosis* H37Ra 1,98 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (6,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), *M. kansasii* 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (10,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Žádná ze syntetizovaných hybridních sloučenin nevykazovala antibakteriální, antifungální nebo cytotoxickou aktivitu.

Na základě výzkumu mých předchůdců⁶⁷ můžeme předpokládat, že dalšího zvýšení antimykobakteriální aktivity by bylo možné dosáhnout obměnou těchto hybridních sloučenin v oblasti PASA. Přesněji maskováním hydrofilní povahy fragmentu PASA vytvořením cyklického laktonu mezi karboxylovou a hydroxylovou funkcí. U takto vzniklých sloučenin můžeme předpokládat lepší prostupnost přes lipofilní membrány a mohou tak být předmětem pro další výzkum.

7 Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

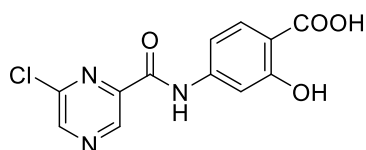
Řešitel: Petr Šlechta

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Konzultant: MSc. Ghada Basem Bouz, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty kombinující fragment pyrazinamidu a 4-aminosalicylové kyseliny jako antimykobakteriální sloučeniny

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je tuberkulóza (TB) celosvětově hlavní příčinou úmrtí na infekční onemocnění způsobené jedním infekčním agens a počet případů s lékově rezistentní TB se neustále zvyšuje. Tyto faktory vytvářejí urgentní potřebu vývoje nových, účinnějších antituberkulotik. Z těchto důvodů v této práci prezentujeme design, syntézu a antimikrobiální zhodnocení série hybridních sloučenin, kombinujících různé deriváty pyrazinamidu a *p*-aminosalicylové kyseliny, jako potencionálních antituberkulotických léčiv. Sloučeniny byly připraveny reakcí různých derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny, po její aktivaci 1,1'-karbonyldiimidazolem s *p*-aminosalicylovou kyselinou v prostředí dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla. Získané sloučeniny byly testovány *in vitro* pro zjištění jejich antimykobakteriální aktivity proti *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra a čtyřem dalším mykobakteriálním kmenům. Připravené sloučeniny byly dále *in vitro* testovány pro zjištění antibakteriální, antifungální a cytotoxické (HepG2) aktivity. Většina sloučenin prokázala antimykobakteriální aktivitu v rozsahu minimální inhibiční koncentrace (MIC) od 3,13—12,5 µg/ml proti *M. tuberculosis* H37Rv. Nejaktivnější sloučenina byla 4-(6-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová kyselina s MIC proti *M. tuberculosis* H37Rv = 3,13 µg/mL (10,7 µmol.l⁻¹). Žádná z připravených sloučenin nevykazovala antibakteriální, antifungální nebo cytotoxickou aktivitu.



8 Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical chemistry and Pharmaceutical analysis

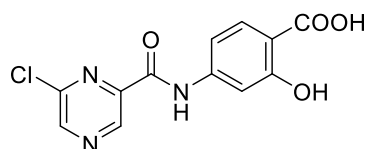
Author: Petr Šlechta

Supervisor: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Consultant: MSc. Ghada Basem Bouz, Ph.D.

Title of diploma thesis: Derivatives combining the fragment of pyrazinamide and 4-aminosalicylic acid as antimycobacterial compounds

According to WHO, tuberculosis (TB) is the leading cause of death from a single infectious organism worldwide and the number of cases with drug resistant TB is still increasing, creating the need for new antituberculotics. Therefore, we report design, synthesis and antimicrobial evaluation of a series of hybrid compounds combining different pyrazinamide derivatives and *p*-aminosalicylic acid as potential antituberculotic agents. The compounds were prepared by mixing different pyrazinecarboxylic acids, after activation by 1,1'-carbonyldiimidazole, with *p*-aminosalicylic acid in dimethylsulfoxide as a solvent. Obtained compounds were *in vitro* tested for their antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra and four other mycobacterial strains. Prepared compounds were also *in vitro* screened for antibacterial, antifungal, and cytotoxic (HepG2) activity. Most compounds showed antimycobacterial activity in range of minimum inhibitory concentration (MIC) from 3.13–12.5 µg/ml against *M. tuberculosis* H37Rv. The most active compound was 4-(6-chloropyrazine-2-carboxamido)-2-hydroxybenzoic acid with MIC against *M. tuberculosis* H37Rv = 3.13 µg/ml (10,7 µmol.l⁻¹). None of the prepared compounds exerted antibacterial, antifungal or cytotoxic activity.



9 Přehled použité literatury

- ¹ Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1> [staženo 28.10.2019]
- ² Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v České republice v roce 2017, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR; Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2017> [staženo 26.11.2019]
- ³ Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie.*, Praha 1996, ISBN 80-238-0297-6
- ⁴ Huard, R. C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L. C. O., van Soolingen, D., Cousins, D., and Ho, J. L. (2006) Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the Mycobacterium tuberculosis complex, *Journal of Bacteriology* 188, 4271-4287.
- ⁵ Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D., and Cole, S. T. (2002) A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3684-3689.
- ⁶ Armstrong, J. A., and Hart, P. D. (1971) RESPONSE OF CULTURED MACROPHAGES TO MYCOBACTERIUM-TUBERCULOSIS, WITH OBSERVATIONS ON FUSION OF LYSOSOMES WITH PHAGOSOMES, *Journal of Experimental Medicine* 134, 713–740.
- ⁷ Dannenberg AM. Jr. (1993) Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis, *Hosp Pract (off Ed)* 28, 51–58.
- ⁸ Davis, J. M., and Ramakrishnan, L. (2009) The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection, *Cell* 136, 37-49.
- ⁹ Šajnar, J.; Martínek, A.; Tuberkulóza dýchacího ústrojí. *Vnitřní lékařství I*. Ostravská univerzita v Ostravě, 2008, Ostrava 2008, ISBN 978-80-7368-507-2
- ¹⁰ Přednáška, Tuberkulóza a její léčba, Přemysl Mladěnka, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017
- ¹¹ WHO | TB drug resistance types. *301 Moved Permanently* [online]. Dostupné z: <http://www9.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/types/en/> [staženo 26.11.2019]
- ¹² Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. Dostupné z: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23553en/s23553en.pdf> [staženo 26.11.2019]
- ¹³ Trunz, B. B., Fine, P. E. M., and Dye, C. (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliarytuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness, *Lancet* 367, 1173-1180.
- ¹⁴ Fine, P. E. M. (1995) VARIATION IN PROTECTION BY BCG - IMPLICATIONS OF AND FOR HETEROLOGOUS IMMUNITY, *Lancet* 346, 1339-1345.
- ¹⁵ Zatloukal P, Kos S, Vašáková M. Tuberkulóza dospělých, Standard léčebného plánu, aktualizace 2016. Dostupné z: <http://www.pneumologie.cz/guidelines/> [staženo 26.11.2019]
- ¹⁶ Vašáková, M.; Hricíková, I.; Kopecká, E. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy. *Remedia*, Praha 2016, 26, 236–241, ISSN 0862-8947
- ¹⁷ Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care, 2017 update. Geneva: World Health Organization; 2017. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255052/9789241550000-eng.pdf;jsessionid=C35FB556A54AFC71D67C0686E4751013?sequence=1> [staženo 26.11.2019]

- 18 WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260494/9789241550079-eng.pdf?sequence=1> [staženo 26.11.2019]
- 19 Rapid communication: key changes to treatment of multidrug-and rifampicin-resistant tuberculosis (MDR/RR-TB). Geneva: World Health Organization; 2018. Dostupné z: https://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_RapidCommunicationMDRTB.pdf?ua=1 [staženo 22.12.2019]
- 20 Brunton, L.; Parker, K.; Blumenthal, D.; Buxton, I. Chemotherapy of tuberculosis, Mycobacterium avium complex disease, and leprosy. In: *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. The McGraw-Hill Companies, New York 2008, ISBN 978-0071443432
- 21 Zhang, Y., and Mitchison, D. (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: a review, *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 7, 6-21.
- 22 Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H., and Sun, Z. H. (1999) Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide, *Journal of Bacteriology* 181, 2044-2049.
- 23 den Hertog, A. L., Menting, S., Pfeldt, R., Warns, M., Siddiqi, S. H., and Anthony, R. M. (2016) Pyrazinamide Is Active against Mycobacterium tuberculosis Cultures at Neutral pH and Low Temperature, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 4956-4960.
- 24 Lamont, E. A., and Baughn, A. D. (2019) Impact of the host environment on the antitubercular action of pyrazinamide, *Ebiomedicine* 49, 374-380.
- 25 Peterson, N. D., Rosen, B. C., Dillon, N. A., and Baughn, A. D. (2015) Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 7320-7326.
- 26 Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C., and Jacobs, W. R. (2000) Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis, *Nature Medicine* 6, 1043-1047.
- 27 Zimhony, O., Vilcheze, C., Arai, M., Welch, J. T., and Jacobs, W. R. (2007) Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 752-754.
- 28 Shi, W. L., Cui, P., Niu, H. X., Zhang, S., Tonjum, T., Zhu, B. D., and Zhang, Y. (2019) Introducing RpsA Point Mutations Delta 438A and D123A into the Chromosome of Mycobacterium tuberculosis Confirms Their Role in Causing Resistance to Pyrazinamide, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63, e02681-18.
- 29 Kim, H., Shibayama, K., Rimbara, E., and Mori, S. (2014) Biochemical Characterization of Quinolonic Acid Phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and Inhibition of Its Activity by Pyrazinamide, *Plos One* 9, e100062.
- 30 He, L., Cui, P., Shi, W. L., Li, Q., Zhang, W. H., Li, M., and Zhang, Y. (2019) Pyrazinoic Acid Inhibits the Bifunctional Enzyme (Rv2783) in Mycobacterium tuberculosis by Competing with tmRNA, *Pathogens* 8, e230.
- 31 Zhang, S., Chen, J. Z., Shi, W. L., Cui, P., Zhang, J., Cho, S., Zhang, W. H., and Zhang, Y. (2017) Mutation in clpC1 encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis, *Emerging Microbes & Infections* 6, e8.
- 32 Gopal, P., Gruber, G., Dartois, R., and Dick, T. (2019) Pharmacological and Molecular Mechanisms Behind the Sterilizing Activity of Pyrazinamide, *Trends in Pharmacological Sciences* 40, 930-940.

- 33 Xie, Z. F., Siddiqi, N., and Rubin, E. J. (2005) Differential antibiotic susceptibilities of starved *Mycobacterium tuberculosis* isolates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4778-4780.
- 34 Zheng, J., Rubin, E. J., Bifani, P., Mathys, V., Lim, V., Au, M., Jang, J., Nam, J., Dick, T., Walker, J. R., Pethe, K., and Camacho, L. R. (2013) para-Aminosalicylic Acid Is a Prodrug Targeting Dihydrofolate Reductase in *Mycobacterium tuberculosis*, *Journal of Biological Chemistry* 288, 23447-23456.
- 35 Hajian, B., Scocchera, E., Shoen, C., Krucinska, J., Viswanathan, K., G-Dayananandan, N., Erlandsen, H., Estrada, A., Mikusova, K., Kordulakova, J., Cynamon, M., and Wright, D. (2019) Drugging the Folate Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*: The Role of Multi-targeting Agents, *Cell Chemical Biology* 26, 781-791.
- 36 Nagachar, N., and Ratledge, C. (2010) Knocking out salicylate biosynthesis genes in *Mycobacterium smegmatis* induces hypersensitivity to p-aminosalicylate (PAS), *Fems Microbiology Letters* 311, 193-199.
- 37 Adilakshmi, T., Ayling, P. D., and Ratledge, C. (2000) Mutational analysis of a role for salicylic acid in iron metabolism of *Mycobacterium smegmatis*, *Journal of Bacteriology* 182, 264-271.
- 38 Gobin, J., Moore, C. H., Reeve, J. R., Wong, D. K., Gibson, B. W., and Horwitz, M. A. (1995) IRON ACQUISITION BY MYCOBACTERIUM-TUBERCULOSIS - ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF IRON-BINDING EXOCHELINS, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5189-5193.
- 39 Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H. W. H., Neefs, J. M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science* 307, 223-227.
- 40 Field, S. K. (2015) Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment?, *Therapeutic Advances in Chronic Disease* 6, 170-184.
- 41 Hicks, D. B., Liu, J., Fujisawa, M., and Krulwich, T. A. (2010) F1F0-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: Lessons from their adaptations, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1797, 1362-1377.
- 42 Maloney, P. C., Kashket, E. R., Wilson, T. H. (1974) A proton motive force drives ATP synthesis in bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 3896-3900.
- 43 Worley, M. V., and Estrada, S. J. (2014) Bedaquiline: A Novel Antitubercular Agent for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis, *Pharmacotherapy* 34, 1187-1197.
- 44 Zumla, A. I., Gillespie, S. H., Hoelscher, M., Philips, P. P. J., Cole, S. T., Abubakar, I., McHugh, T. D., Schito, M., Maeurer, M., and Nunn, A. J. (2014) New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects, *Lancet Infectious Diseases* 14, 327-340.
- 45 Svensson, E. M., Murray, S., Karlsson, M. O., and Dooley, K. E. (2015) Rifampicin and rifapentine significantly reduce concentrations of bedaquiline, a new anti-TB drug, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70, 1106-1114.
- 46 Gouloze, S. C., Cohen A. F., Rissmann R. (2015) Bedaquiline, *British Journal of Clinical Pharmacology* 80, 182-184.
- 47 Winter, H., Egizi, E., Murray, S., Erondy, N., Ginsberg, A., Rouse, D. J., Severynse-Stevens, D., and Pauli, E. (2015) Evaluation of the Pharmacokinetic Interaction between Repeated Doses of Rifapentine or Rifampin and a Single Dose of Bedaquiline in Healthy Adult Subjects, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 1219-1224.

- 48 STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Souhrn údajů o přípravku*. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sirturo-epar-product-information_cs.pdf [staženo 01.12.2019]
- 49 Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M., Tsubouchi, H., Sasaki, H., Shimokawa, Y., and Komatsu, M. (2006) OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice, *Plos Medicine* 3, 2131-2144.
- 50 EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Assessment Report: Delytba*. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/delytba-epar-public-assessment-report_en.pdf [staženo 01.12.2019]
- 51 STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV. *Souhrn údajů o přípravku*. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/delytba-epar-product-information_cs.pdf [staženo 01.12.2019]
- 52 Stover, C. K., Warrener, P., VanDevanter, D. R., Sherman, D. R., Arain, T. M., Langhorne, M. H., Anderson, S. W., Towell, J. A., Yuan, Y., McMurray, D. N., Kreiswirth, B. N., Barry, C. E., and Baker, W. R. (2000) A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis, *Nature* 405, 962-966.
- 53 Lenaerts, A. J., Gruppo, V., Marietta, K. S., Johnson, C. M., Driscoll, D. K., Tompkins, N. M., Rose, J. D., Reynolds, R. C., and Orme, I. M. (2005) Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of in vitro and in vivo models, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2294-2301.
- 54 Singh, R., Manjunatha, U., Boshoff, H. I. M., Ha, Y. H., Niyomrattanakit, P., Ledwidge, R., Dowd, C. S., Lee, I. Y., Kim, P., Zhang, L., Kang, S. H., Keller, T. H., Jiricek, J., and Barry, C. E. (2008) PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release, *Science* 322, 1392-1395.
- 55 Tyagi, S., Nuermberger, E., Yoshimatsu, T., Williams, K., Rosenthal, I., Lounis, N., Bishai, W., and Grosset, J. (2005) Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2289-2293.
- 56 Ginsberg, A. M., Laurenzi, M. W., Rouse, D. J., Whitney, K. D., and Spigelman, M. K. (2009) Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of PA-824 in Healthy Subjects, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 3720-3725.
- 57 FDA. *Medication guide*. Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/212862s0001bl.pdf#page=19 [staženo 02.12.2019]
- 58 Shindikar, A. V., and Viswanathan, C. L. (2005) Novel fluoroquinolones: design, synthesis, and in vivo activity in mice against *Mycobacterium tuberculosis* H(37)Rv, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1803-1806.
- 59 Beteck, R. M., Seldon, R., Jordaan, A., Warner, D. F., Hoppe, H. C., Laming, D., Legoabe, L. J., and Khanye, S. D. (2019) Quinolone-isoniazid hybrids: synthesis and preliminary in vitro cytotoxicity and anti-tuberculosis evaluation, *Medchemcomm* 10, 326-331.
- 60 Xu, Z., Zhao, S. J., Lv, Z. S., Gao, F., Wang, Y. L., Zhang, F., Bai, L. Y., and Deng, J. L. (2019) Fluoroquinolone-isatin hybrids and their biological activities, *European Journal of Medicinal Chemistry* 162, 396-406.
- 61 Tripathy, R., Reiboldt, A., Messina, P. A., Iqbal, M., Singh, J., Bacon, E. R., Angeles, T. S., Yang, S. X., Albom, M. S., Robinson, C., Chang, H., Ruggeri, B. A., and Mallamo, J. P. (2006) Structure-guided identification of novel VEGFR-2 kinase inhibitors via solution phase parallel synthesis, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16, 2158-2162.
- 62 Jiang, T., Kuhen, K. L., Wolff, K., Yin, H., Bieza, K., Caldwell, J., Bursulaya, B., Wu, T. Y. H., and He, Y. (2006) Design, synthesis and biological evaluations of novel oxindoles as

HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Part I, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16, 2105-2108.

- ⁶³ Paul, R., and Anderson, G. W. (1960) N,N'-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming Reagent, *Journal of the American Chemical Society* 82, 4596-4600.
- ⁶⁴ Kakemi et al. (1961) *Yakugaku Zasshi/Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 81, p. 1609,1613, (1962) *Chemical Abstracts* 56, # 10141.
- ⁶⁵ Tostmann, A., Boeree, M. J., Peters, W. H. M., Roelofs, H. M. J., Aarnoutse, R. E., van der Ven, A., and Dekhuijzen, P. N. R. (2008) Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce in vitro pyrazinamide toxicity, *International Journal of Antimicrobial Agents* 31, 577-580.
- ⁶⁶ Zítko, J., Servusova, B., Paterova, P., Mandikova, J., Kubicek, V., Kucera, R., Hrabcova, V., Kunes, J., Soukup, O., and Dolezal, M. (2013) Synthesis, Antimycobacterial Activity and In Vitro Cytotoxicity of 5-Chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamides, *Molecules* 18, 14807-14825.
- ⁶⁷ Diplomová práce, Sloučeniny kombinující fragment pyrazinamidu a p-aminosalicylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika II, Ondřej Žák, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018