

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Syntéza a hodnocení *N*-pyridylbenzamidů jako potenciálních
antimikrobních sloučenin**

Diplomová práce

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

Vypracovala: Eliška Suchánková

Hradec Králové, 2020

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

V Hradci Králové, květen 2020

.....
Eliška Suchánková

Poděkování

Mé největší poděkování patří doc. PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D. za všechnu pomoc, odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu, přátelský přístup a nadšení pro věc. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na biologickém a chemickém testování látek.

Výzkum prezentovaný v této diplomové práci byl podpořen Grantovou agenturou České republiky (20-19638Y) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (SVV 260 547).

Obsah

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1. CÍL PRÁCE.....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 TUBERKULÓZA (TB).....	10
2.1.1 <i>Co za nemoc může.....</i>	<i>10</i>
2.1.2 <i>Jak nákaza probíhá.....</i>	<i>10</i>
2.1.3 <i>Jak se nemoc projevuje.....</i>	<i>11</i>
2.1.4 <i>Jak s jistotou diagnostikovat TB</i>	<i>11</i>
2.1.5 <i>TB v číslech</i>	<i>12</i>
2.2 OČKOVÁNÍ.....	14
2.3 MOŽNOSTI LÉČBY.....	14
2.3.1 <i>První linie.....</i>	<i>14</i>
2.3.2 <i>Druhá linie</i>	<i>18</i>
2.3.3 <i>V klinickém hodnocení.....</i>	<i>19</i>
2.4 PRŮBĚH LÉČBY.....	20
2.5 REZISTENCE	20
2.6 PYRIDIN VE STRUKTURÁCH LÉČIV	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A METODY	24
3.2 PRINCIP PŘÍPRAVY PRODUKTŮ.....	25
3.3 OBECNÝ POSTUP PŘÍPRAVY PRODUKTŮ	26
3.4 DODATEČNÁ IZOLACE VOLNÝCH BAZÍ Z JEJICH HYDROCHLORIDŮ	26
3.5 NOVĚ PŘIPRAVENÉ SLOUČENINY	28
3.6 BIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ LÁTEK	41
3.6.1 <i>Antimykobakteriální aktivita</i>	<i>41</i>
3.6.2 <i>In vitro cytotoxicita.....</i>	<i>43</i>
4. DISKUZE	46
5. ZÁVĚR	52
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	53

Abstrakt

SYNTÉZA A HODNOCENÍ *N*-PYRIDYLBENZAMIDŮ JAKO POTENCIÁLNÍCH ANTIMIKROBNÍCH SLOUČENIN

Eliška Suchánková

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika

Deriváty *N*-pyridylbenzamidů byly navrženy a připraveny pro *in vitro* testování jejich antimykobakteriální aktivity proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum* a *in vitro* cytotoxicity u HepG2 buněčné linie. Tyto sloučeniny jsou pyridinová analoga dříve připravených *N*-pyrazinylbenzamidů, které vykazovaly významnou *in vitro* antimykobakteriální aktivitu. Látky byly syntetizovány acylací aminopyridinu nebo chlorpyridin-2-aminu vybranými benzoylchloridy.

Finální sloučeniny byly popsány pomocí elementární analýzy, teplot tání, ^1H a ^{13}C spektra a IČ spektroskopii.

Obecně, připravené sloučeniny vykazují nižší antimykobakteriální aktivitu než dříve hodnocené *N*-pyrazinylbenzamidy. Nicméně jsou případy, ve kterých byly deriváty pyridinu v porovnání s pyrazinovými deriváty účinnější; především proti *M. smegmatis*. Nejlepší aktivita byla prokázána u derivátů odvozených od 2-amino-6-chlorpyridinu a substituovaných benzoylchloridů, což odpovídá i vyšší lipofilitě těchto látek; konkrétně nejúčinnější je *N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-4-methylbenzamid (JZ-EV 14) s MIC 15,625 $\mu\text{g/ml}$ (63,4 μM) proti *Mtb* H37Ra a 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (126,7 μM) proti *M. smegmatis*. Bohužel deriváty *N*-pyridylbenzamidů s lepší antimykobakteriální aktivitou vykazují v porovnání s *N*-pyrazinylbenzamidů také poměrně vysokou *in vitro* cytotoxicitu ($\text{SI} < 10$) u HepG2 buněčné linie.

Abstract

SYNTHESIS AND EVALUATION OF *N*-PYRIDYLBENZAMIDES AS POTENTIAL ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

Eliška Suchánková

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

The derivatives of *N*-pyridylbenzamide were designed and synthesized to be *in vitro* tested for antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum* and *in vitro* cytotoxicity in HepG2 cells. These compounds are pyridinyl analogues of previously prepared *N*-pyrazinylbenzamides that have shown a significant *in vitro* antimycobacterial activity. The title compounds were synthesized by acylation of aminopyridine or chloropyridine-2-amine by selected benzoyl chlorides.

Final compounds were described by elementary analysis, melting point, ¹H and ¹³C spectra and IR spectroscopy.

Generally, prepared compounds possess lower antimycobacterial activity than previously tested *N*-pyrazinylbenzamides. However, there are some cases, in which the derivatives of pyridine were more effective compared to the derivatives of pyrazine; mainly against *M. smegmatis*. The best antimycobacterial activity was proved for derivatives of 2-amino-6-chloropyridine and substituted benzoyl chloride, corresponding with higher lipophilicity of these compounds; specifically the most effective one is *N*-(6-chloropyridin-2-yl)-4-methylbenzamide (JZ-EV 14) with MIC 15,625 µg/ml (or 63,4 µM) against *Mtb* H37Ra and 31,25 µg/ml (or 126,7 µM) against *M. smegmatis*. Unfortunately, the derivatives of *N*-pyridylbenzamide with better antimycobacterial activity have also relatively high *in vitro* cytotoxicity (SI < 10) in HepG2 cell line compared to *N*-pyrazinylbenzamides.

Seznam použitých zkratek

ACP	součást cyklu biosyntézy mastných kyselin (Acyl Carrier Protein)
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacille Calmette-Guérin
CDCl_3	chloroform
$\text{Clog } P$	vypočítaný $\log P$
CNS	centrální nervový systém
CPX	ciprofloxacín
CT	počítačová tomografie
CYP	cytochrom P450
DCM	dichlormethan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DS-TB	TB citlivá na léky (drug-susceptible TB)
EKG	elektrokardiografie
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
EtOAc	ethylacetát
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
HDACi	inhibitory histon deacetylázy
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
IC	inhibiční koncentrace
IČ	infračervené
INH	isoniazid
$\log P$	rozdělovací koeficient pro ionizovatelné sloučeniny mezi n-oktanol a vodu
MDR-TB	TB rezistentní k isoniazidu a rifampicinu (Multi-Drug Resistant TB)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MR	magnetická rezonance
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MÚ	mechanismus účinku
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance

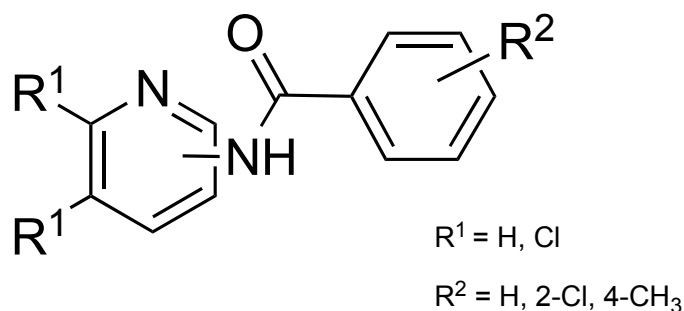
NÚ	nežádoucí účinek
POA	kyselina pyrazinová
QAPRTáza	fosforibosyltransferáza kyseliny chinolinové
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
RR-TB	(Rifampicin Resistant TB)
SI	index selektivity
TB	tuberkulóza
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TMS	tetramethylsilan
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XDR-TB	(Extensively-Drug Resistant TB)

1. Cíl práce

Cílem naší práce je syntéza série derivátů *N*-pyridylbenzamidů (obr. č. 1), izosterů odvozených od dříve připravených *N*-pyrazinylbenzamidů vykazujících určitou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*.¹

Připravené sloučeniny budou analyticky charakterizovány (teplota tání, elementární analýza, IČ spektrum, ¹H NMR a ¹³C NMR spektrum) a budou pro ně vypočteny hodnoty dekadického logaritmu rozdělovacího koeficientu (log *P*, Clog *P*).

Po *in vitro* testování antimikrobní aktivity námi nasyntetizovaných sloučenin proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *M. smegmatis*, *M. aurum* a posouzení jejich *in vitro* cytotoxicity bude následovat vyhodnocení vztahu struktura-účinek.



Obr. č. 1: Deriváty *N*-pyridylbenzamidů

2. Teoretická část

2.1 Tuberkulóza (TB)

Vysoce nakažlivé infekční onemocnění, ve spoustě případech přebývajících v latentní formě, přenosné vzduchem pouhým zakašláním nemocného, případně přímým kontaktem s nemocným, jedna z 10 nejčastějších příčin úmrtí na světě, mezi infekcemi dokonce nejmrtelnější (společně s HIV/AIDS²) – to vše charakterizuje tuberkulózu.

2.1.1 Co za nemoc může

Původcem tohoto onemocnění jsou aerobní, tedy na kyslíku závislé bakterie souhrnně označované jako *Mycobacterium tuberculosis* complex, jejímiž nejčastějšími zástupci jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti* a další. Jedná se o G⁺ bakterie, tyčkovitého tvaru, které jsou specifické pro přítomnost velkého množství proteinů, polysacharidů (např. arabinogalaktanu navázaného na vrstvu peptidoglykanu) a lipidů, zejména mykolových kyselin kovalentně vázaných k arabinogalaktanu v buněčné stěně, což způsobuje její nepropustnost pro Gramovo barvení – i přesto jsou zařazovány mezi G⁺ bakterie díky absenci vnější buněčné membrány. Bohatý obsah látek v buněčné stěně je také příčinou její nízké propustnosti, a tudíž poměrně časté rezistence k léčivům, zároveň to může být i důvod vysoké virulence.³⁻⁵

Vedle TB a jí způsobujících typických patogenních bakterií existuje řada netuberkulozních mykobakterií, které vyvolávají rovněž plicní či mimoplicní onemocnění označované jako mykobakteriózy. Mezi tyto atypické mykobakterie patří například komplex *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. scrofulaceum* či *M. szulgai*.⁶

2.1.2 Jak nákaza probíhá

K přenosu bakterie od nemocného jedince dochází nejčastěji kapénkovou cestou nákazy – vstupní branou infekce jsou dýchací cesty. Po vdechnutí bakterie dochází k jejímu pohlcení makrofágy v plicních alveolách, hromadění T-lymfocytů a vzniku granulomu, zánětlivého ložiska. Tento proces se odehrává v rámci primární infekce, která bývá často asymptomatická a bez výraznějších následků – buď imunitní systém bakterie zlikviduje nebo se zapouzdří a nadále přebývají v latentní formě. Právě T-lymfocyty v místě zánětu jsou po čase zodpovědné za tuberkulinovou reakci, znak získané imunity. Avšak po určité době může dojít k reaktivaci primární infekce a propuknutí postprimární tuberkulózy. Impulsem je buď inhalace nových mykobakterií nebo oslabení organismu různými

faktory, jako jsou malnutrice, alkoholismus, kouření či těhotenství. V této fázi dochází k destrukci plicní tkáně a erozi malých cév, což je příčinou následné hemoptoe. Sekundární infekce se týká cca 5-10 % nakažených a tato fáze už je nebezpečná i pro okolí nemocného, protože pouze člověk s aktivní formou TB může být zdrojem nákazy. Mezi ohrožené jedince patří především ti s oslabenou obranyschopností imunitního systému, to znamená pacienti s HIV/AIDS, diabetem mellitem, onemocněním jater, probíhající virovou infekcí nebo léčení glukokortikoidy.⁷⁻⁸

2.1.3 Jak se nemoc projevuje

Na rozdíl od primární infekce lokalizované zejména v plicích, případně přenosem lymfogenní cestou v nejbližších lymfatických uzlinách, se sekundární infekce může rozšířit do celého těla, ať už krevním oběhem či lymfatickým systémem, a poté hovoříme o mimoplicní TB. Při ní dochází k poškození jednotlivých orgánů, podle čehož můžeme rozlišovat několik poddruhů extrapulmonální TB, v některých případech i s charakteristickými symptomy – lymfadenitida při zasažení mízních uzlin s typicky zvětšenými uzlinami, tuberkulóza kostí a kloubů provázená bolestmi, sníženou pevností kostí, otoky kloubů a omezenou pohyblivostí, tuberkulóza centrální nervové soustavy s bolestmi hlavy, změnami osobnosti, meningismem, dále tuberkulóza trávicího traktu a s ní spojené bolesti břicha, průjem, krev ve stolici či tuberkulóza urogenitálního traktu zapříčiňující dysurii a hematurii.⁹

Většina nakažených má však pulmonální formu TB, která se projevuje jak nespecifickými symptomy, např. horečkou, chronicky trvající únavou, poklesem fyzické výkonnosti, úbytkem na váze, nechutenstvím nebo pocením v noci, tak pro TB specifickými příznaky, konkrétně vykašlávání, bolest na hrudi a v pozdějších stádiích hemoptýza až hemoptoe.

2.1.4 Jak s jistotou diagnostikovat TB

Jakmile se tedy objeví pacient s výše uvedenými projevy, mělo by být provedeno komplexní vyšetření lékařem; jako u téměř každé nemoci je základem úspěšné léčby včasná diagnostika a správně nasazená antituberkulózní terapie. Pro diagnostiku latentní infekce lze využít tuberkulinový test, který v případě positivity indikuje dřívější kontakt pacienta s bakterií a následné vytvoření specifické imunity. V tomto případě je vhodné provést další vyšetření pro vyloučení aktivní TB¹⁰ – důležitá je podrobná anamnéza, skiagram hrudníku, zobrazovací metody jako např. CT a MR u mimoplicní formy TB pro identifikaci lézí v mozku, kostech či jiných orgánech,¹¹ a nezbytné je laboratorní

mikrobiologické vyšetření. Biologickým materiálem odebíraným pro testování bývá nejčastěji sputum, pleurální výpotek či aspirát, v případě podezření na mimoplicní formu TB se vyšetřuje v závislosti na lokalizaci mozkomíšni mok/menstruační krev/střední proud moči/stolice aj. Doplnkově může být provedeno i vyšetření histopatologické, při kterém se hodnotí vzorek tkáně získaný biopsií na (ne)přítomnost granulomu a *M. tuberculosis*.⁶

Jak již bylo zmíněno dříve, buněčná stěna mykobakterií je nepropustná pro Gramovo barvení, proto je k jejich detekci s výhodou využíváno Ziehl-Neelsenovo či fluorescenční barvení, po kterém lze pod mikroskopem pozorovat bakterie jako acidorezistentní tyčky – výsledky vyšetření jsou v tomto případě dostupné již během pár hodin. Mezi další možnosti rychlé detekce patří molekulárně biologické metody, kterými jsou například polymerázová řetězová reakce či ligázová řetězová reakce pomocí genetických sond a dále sem řadíme urychlené kultivační testy založené na detekci spotřeby kyslíku rostoucích mykobakterií či detekci metabolických produktů během jejich růstu. Pro potvrzení přítomnosti a určení druhu mykobakterie musí být však všechny výsledky z těchto rychlých vyšetření ještě ověřeny provedením kultivace materiálu na speciálních živných půdách. Jelikož mykobakterie má na rozdíl od ostatních bakterií dlouhou generační dobu – dělí se jednou za 24 hodin – je to dlouhodobější proces. Kultury bakterií se odečítají po 3, 6 a 9 týdnech, následně je potvrzena přítomnost/nepřítomnost a případně citlivost mykobakterií na základní antituberkulotika.^{6, 11-12}

2.1.5 TB v číslech

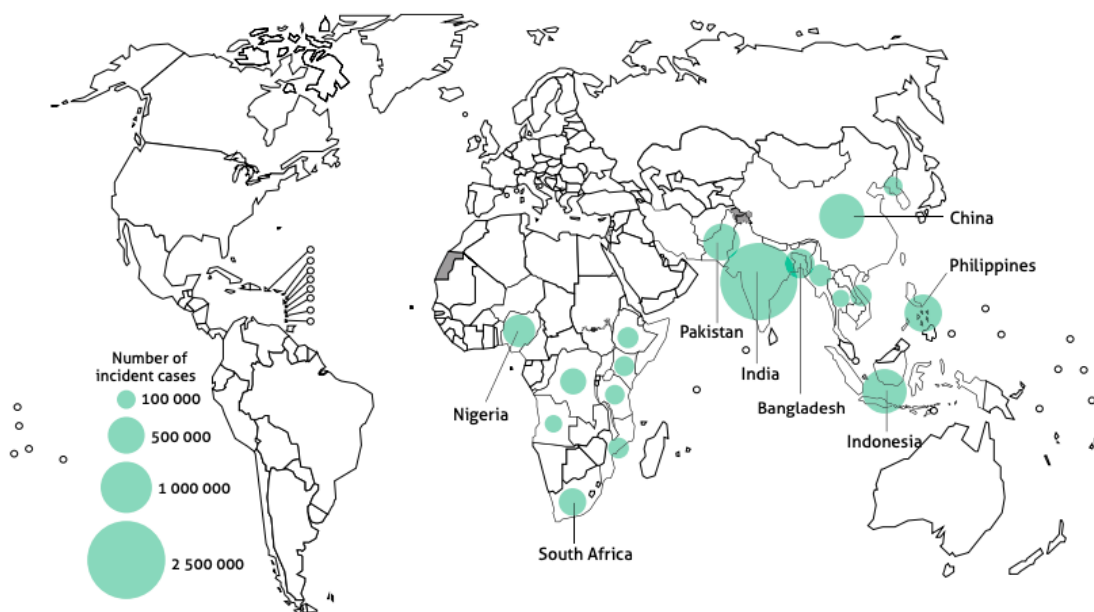
Každoročně jsou takto diagnostikovány miliony nových případů tuberkulózy po celém světě – konkrétně by se dala situace shrnout následovně: podle nejnovějších údajů zveřejněných WHO je až čtvrtina světové populace nakažena mykobakterií, jen za rok 2018 přibylo cca 7 000 000 nových potvrzených případů, plus další 3 miliony jsou odhadovány bez ověřujícího vyšetření.² Onemocnění však zůstává u většiny nakažených v latentní formě, a tak se za celý život dotyčného nemusí nijak projevit; uvádí se, že pouze u 10% nositelů bakterie propukne v aktivní infekci.¹³ Tuberkulóza se týká všech věkových kategorií obou pohlaví, dle statistik z roku 2018 bylo nejvíce nakažených mezi muži nad 15 let (57 %), dále byly ženy ve věku nad 15 let (32 %) a 11 % čítaly děti do 15 let.

Během roku 2018 nemoci podlehl 1,5 milionu pacientů, což je sice o 100 tisíc méně než v předcházejícím roce, přesto však TB stále figuruje na předních příčkách žebříčku smrtících infekcí.²

Největším problémem zůstává TB především v jihovýchodní Asii (44 %), Africe (24 %) a oblasti západního Pacifiku (18 %), z jednotlivých zemí mluvíme konkrétně o Indii, Číně, Indonésii, Filipínách, Pákistánu, Nigérii, Bangladéši a státech jižní Afriky (obr. č. 2).

V menší míře se TB vyskytuje v zemích Středního východu (8 %), amerických (3 %) a evropských státech (3 %). V České republice bylo v roce 2018 evidováno 444 nakažených TB.²

Estimated TB incidence in 2018, for countries with at least 100 000 incident cases



Obr. č. 2: Incidence TB v roce 2018, převzato z WHO² pod licenci CCBY-NC-SA3.0IGO;

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>

Délka terapie je minimálně 6 měsíců v případě TB reagující na léčiva 1. volby (DS-TB) a až 24 měsíců (někdy i více) u pacientů s multirezistentní TB (MDR-TB). Pro zajímavost z posledních statistik (2018): péče o pacienta s DS-TB vyšla v průměru na 973 USD, u pacienta s MDR-TB stála 6430 USD.²

Důležitým krokem k redukci počtu případů je snížení rizikových faktorů jako je kouření, diabetes, infekce HIV aj. podporujících nákazu a rozvoj TB z latentní do aktivní formy,

dále očkování, včasná diagnostika nemoci a především správně zvolená léčba u nakažených pacientů.²

2.2 Očkování

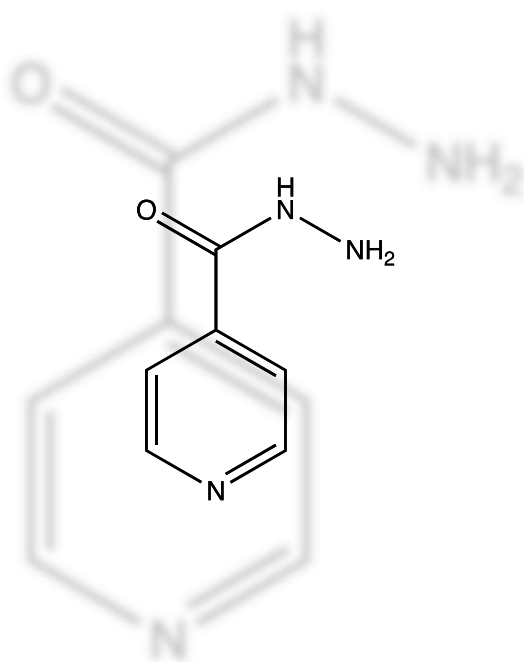
Mezi preventivní opatření do jisté míry zabraňující rozvoji tuberkulózy patří BCG vakcinace novorozenců.¹⁴ Pro očkování se používá oslabený kmen *M. bovis* a následně získaná imunita zodpovídá za rychlejší a intenzivnější reakci.⁸ BCG vakcína, zatím jako jediná schválená, je dobrá především na ochranu před závažnými typy TB u dětí a WHO ji doporučuje zejména v zemích s vysokou incidencí TB.² V ČR bylo povinné očkování do roku 2010, nyní se provádí jen u rizikových skupin dětí.

2.3 Možnosti léčby

Léky na TB jsou děleny do dvou hlavních tříd; tzv. 1. linie je tvořena léčivy užívanými ve většině případů, a to především díky jejich vysoké účinnosti a zároveň přijatelnému stupni toxicity. 2. linie antituberkulotických léčiv zahrnuje zástupce vhodné pro léčbu rezistentních forem TB nebo pacientů, u kterých jsou léky 1. linie kontraindikovány; nevýhodou této skupiny je nižší účinnost a vyšší frekvence nežádoucích účinků.¹⁵

2.3.1 První linie

Přehled a stručná charakteristika léčiv:



Isoniazid,

chemicky hydrazid kyseliny isonikotinové, je doposud nejúčinnější antituberkulotikum zahrnuté v každé antituberkulotické terapii.¹⁶ Je účinný jak na *M.tuberculosis*, tak na netuberkulózní mykobakterie.

Místem jeho účinku je buněčná stěna mykobakterie, ve které inhibuje syntézu mykolových kyselin prostřednictvím blokády enzymu katalyzujícího prodlužování jejich řetězce. Isoniazid je totiž proléčivo, z něhož se působením mykobakteriálního enzymu katalázy/peroxidázy odštěpuje hydrazidová

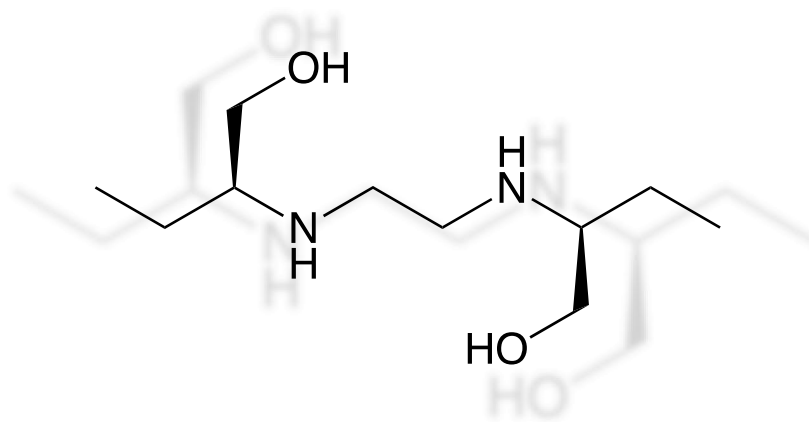
skupina za vzniku isonikotinoylového radikálu, který tvoří komplex s NAD⁺ a ten je velmi silným inhibitorem NADH-dependetní enoyl-ACP reduktázy, která za normálních okolností katalyzuje biosyntézu mykolových kyselin buněčné stěny.¹⁷⁻¹⁸

V případě jeho podání v monoterapii hrozí vznik rezistence (což se netýká profylaktického podání při latentní TB).⁸ Největším problémem při léčbě isoniazidem může být jeho hepatotoxicita (většina se metabolizuje acetylací v játrech) a neurotoxicita způsobená potlačením funkce vitamínu B₆, proto je během léčby důležitá jeho suplementace.

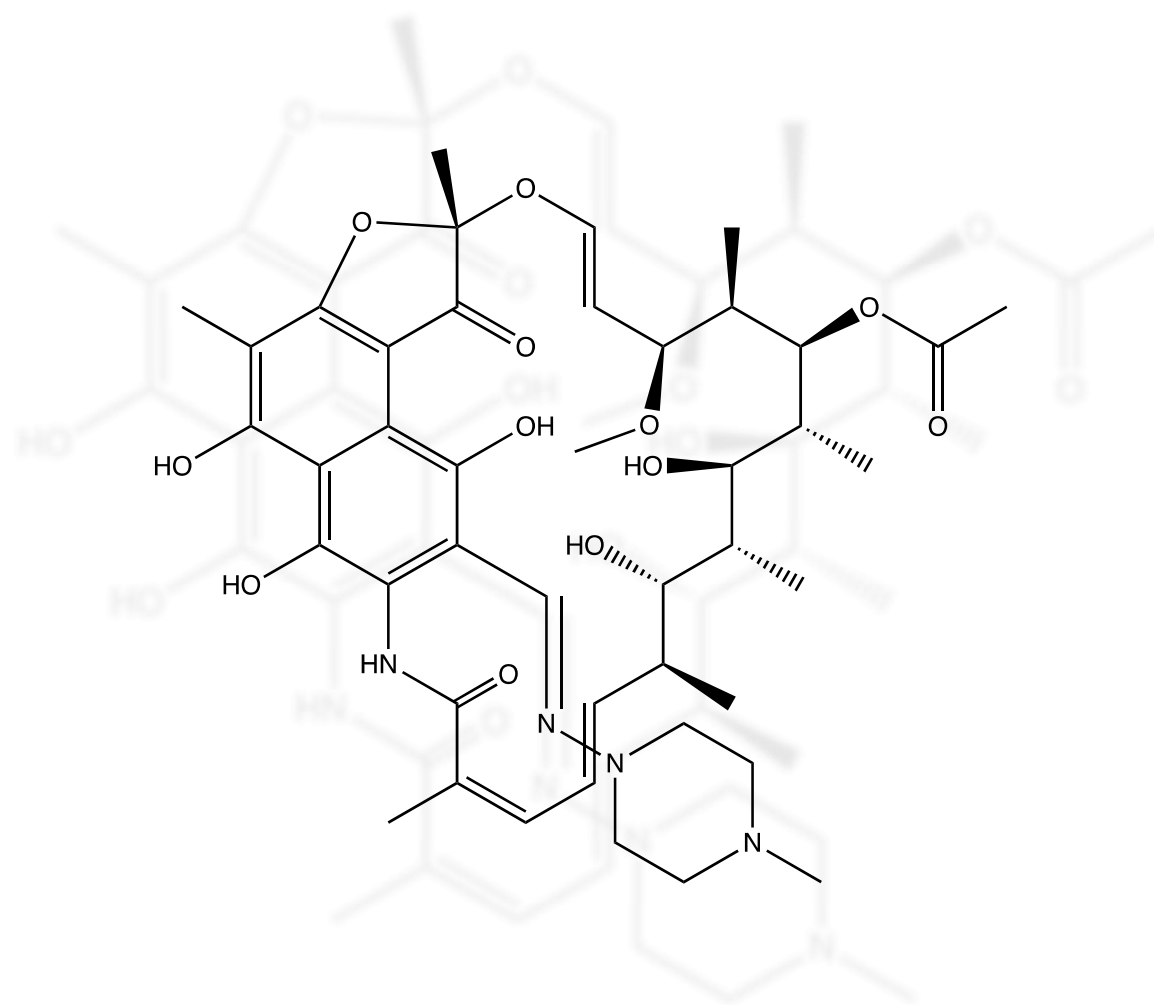
Ethambutol,

derivát ethylendiaminu, podobně jako isoniazid účinkuje v buněčné stěně mykobakterie, avšak trošku jiným mechanismem – narušuje její tvorbu zásahem do syntézy

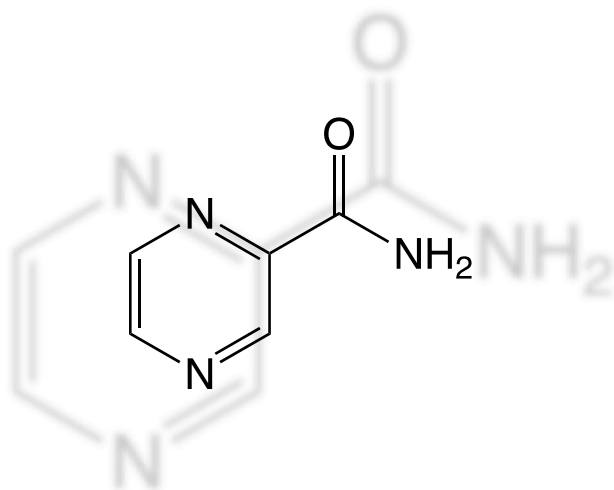
cukerné složky pomocí inhibice polymerace arabinosy na arabinan. Působí na *M. tuberculosis* i na netuberkuloidní kmeny mykobakterií.⁸ Oproti isoniazidu není tak účinným antituberkulotikem, avšak v kombinaci s ostatními snižuje jejich toxicitu.¹⁶ Jeho výhodou je především absence hepatotoxicity, může se ale objevit retrobulbární neuritida s poruchami vidění či hyperurikémie.^{8, 16}



Rifampicin,



léčivo inhibující DNA-dependentní RNA-polymerázu bakterií, čímž narušuje syntézu nukleových kyselin a proteinů, je antibiotikum účinné zejména na léčbu infekcí způsobených *M. tuberculosis*, *M. leprae* a kromě nich i stafylokokových infekcí. Musí být podáván v kombináční léčbě k prevenci vzniku rezistence. Pozorovatelným nežádoucím účinkem bývá oranžovo-červené obarvení tělních tekutin (slz, slin a moči) a také mírná hepatotoxicita. Pro pacienty užívající další léky, např. statiny či perorální kontracepci, může být nepříjemnou komplikací také indukční potenciál rifampicinu na metabolizující enzymy a P-glykoprotein, který zapříčiňuje snížení účinku těchto současně užívaných léčiv.⁸



Pyrazinamid,

amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny, v porovnání s ostatními antituberkulotiky 1. linie méně účinnější lék, lze užít jen při infekci *M. tuberculosis*. Jedná se o proléčivo, které musí být nejdříve přeměněno na svůj aktivní metabolit kyselinu pyrazinovou (POA), k čemuž dochází

uvnitř mykobakterie působením enzymu pyrazinamidázy (schéma č. 1).¹⁹ Původní teorie uváděla, že podání pyrazinamidu je vhodné zejména v úvodní fázi léčby na usmrcení mykobakterií pohlcených makrofágy, uvnitř kterých je kyselé pH; v pozdějších fázích se stoupajícím pH vlivem odeznívajícího zánětu se podle ní pyrazinamid stává neúčinným.²⁰ Nové důkazy však naznačují, že pyrazinamid je účinný i při neutrálním pH. Zároveň zůstává neobjasněn přesný mechanismus účinku POA – nejnovější poznatky zmiňují vazbu POA na enzym aspartát dekarboxylázu, čímž narušují syntézu koenzymu A nezbytného pro metabolismus mastných kyselin.²¹⁻²² Mezi hlavní nežádoucí účinky pyrazinamidu patří porucha jaterních funkcí, nauzea, myalgie a hyperurikémie.^{8,20} Z kombinace struktur pyrazinamidu a isoniazidu vychází námi nově připravované látky.

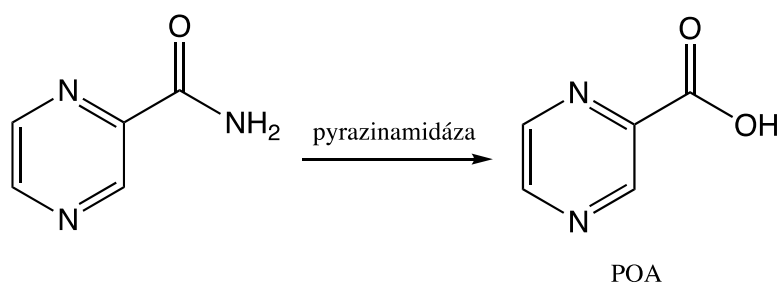


Schéma č. 1: Metabolizace pyrazinamidu na POA působením pyrazinamidázy

2.3.2 Druhá linie

Přichází na řadu v případě rezistence mykobakterií na léčiva 1. linie:

Streptomycin bylo vůbec první antibiotikum používané proti *Mycobacterium tuberculosis*. Cílem působení jsou ribozomy, ve kterých inhibuje syntézu proteinů mykobakterie.²³ Jeho nadměrné užívání v monoterapii vedlo rychle k rozvoji rezistence a kvůli závažným NÚ (ototoxicita, nefro- a neurotoxicita) nachází uplatnění především při léčbě recidiv TB.²⁰

Dalšími používanými aminoglykosidovými antibiotiky jsou **kanamycin** a **amikacin** se stejným MÚ i NÚ jako má streptomycin. Inhibicí proteosyntézy působí rovněž cyklické peptidové antibiotikum **kapreomycin**.⁸

Cyklický analog D-alaninu **cykloserin** účinkuje v mykobakterii na základě podobnosti s touto aminokyselinou. Způsobuje blokádu enzymů důležitých pro syntézu peptidoglykanů, čímž narušuje tvorbu buněčné stěny. Jeho využití je však značně omezené kvůli relativně častým poruchám CNS.^{15, 16, 24}

Ethionamid, chemicky thioamid kyseliny nikotinové, je podobný isoniazidu nejen strukturně, ale i mechanismem účinku. Proléčivo aktivované monooxygenázou EthA inhibuje přes vzniklý adukt ETH-NAD enoyl-ACP reduktázu, čímž zastavuje syntézu mykolových kyselin a tím brání výstavbě buněčné stěny.^{16, 25-26} Používá se v kombinační léčbě na multirezistentní kmeny mykobakterií. Analogickým MÚ působí i **prothionamid**, který má zároveň i podobné vedlejší účinky jako ethionamid.²⁷

Para-aminosalicylová kyselina je v porovnání s ostatními léčivy méně účinná a jsou u ní poměrně časté gastrointestinální NÚ. Jedná se o selektivní antimetabolit zasahující do syntézy kyseliny listové v mykobakterii na základě jeho strukturní podobnosti s prekursorem folátu kyselinou *para*-aminobenzoovou.²⁸ V dnešní době je její využití minimální.

Větší skupinu léčiv pro terapii TB představují fluorochinolony. Všechny působí inhibicí syntézy DNA blokádou enzymu gyrázy zodpovědného za správný průběh replikace DNA. Při léčbě TB se v poslední době jeví jako nejvhodnější zástupci **levofloxacin, gatifloxacin a moxifloxacin**.²⁹⁻³⁰

Nově schválená léčiva pro léčbu multirezistentní tuberkulózy jsou bedachilin a delamanid, limitací jejich použití je však vysoká cena a vždy musí být součástí kombinační terapie. Doba podávání se pohybuje okolo 6 měsíců a v případě obou léčiv

je vhodné monitorovat EKG, protože mají potenciál prodlužovat QT interval.^{20, 31} **Bedachilin**, strukturně diarylchinolin, inhibuje mykobakteriální enzym ATP-syntázu, který je důležitý pro tvorbu energie v bakterii.³² Kromě již zmíněné kardiotoxicity může rovněž nepříznivě ovlivňovat jaterní funkce; navíc jeho metabolizace N-demethylací pomocí enzymů CYP 450 zvyšuje riziko interakcí s ostatními léky indukujícími/inhibujícími tyto enzymy.³³ FDA schválila bedachilin v roce 2012³⁴ a na doporučení WHO je s výhodou používán u léčby MDR- i XDR-TB. Druhý uvedený **delamanid** (schválení EMA, 2014³¹) má v porovnání s bedachilinem méně studií o účinnosti;³⁴ spíše než u extensivně rezistentních kmenů mykobakterií je využíván při léčbě MDR-TB. Strukturou se jedná o nitroimidazol, který inhibuje syntézu mykolových kyselin.³⁵

2.3.3 V klinickém hodnocení

Dalším nitroimidazolem, který *in vitro* a *in vivo* vykazoval aktivitu proti *M. tuberculosis* a nyní je předmětem klinického výzkumu je **pretomanid**.³⁶

Možnost léčby MDR a XDR-TB je diskutována i u oxazolidinonových antibiotik linezolidu, sutezolidu a kontezolidu, inhibujících syntézu bílkovin vazbou na podjednotku ribozomu 50S. Spektrum účinku **linezolidu** zahrnuje především G+ bakterie včetně rezistentních kmenů, jeho nevýhodou je však při dlouhodobém podávání projev závažných NÚ, kterými jsou anémie, trombocytopenie a periferní neuropatie. Přesto už je v postupech WHO zařazen mezi léky volby v rámci léčiv 2. linie.³⁷ **Sutezolid** má dokonce podle dosavadních studií kromě vysoké účinnosti i dobrý bezpečnostní profil,³⁶ stejně jako **kontezolid** v první fázi klinického hodnocení.³⁸

Zatím nadějně, v druhé fázi klinického testování, vypadá i nová molekula objevená pomocí kombinatoriální chemie s farmakoforem diaminu vyskytujícího se i v molekule ethambutolu³⁹ – jedná se o **SQ109**, ethylendiamin, jehož místem účinku v mykobakterii je transportér určený pro včlenění mykolových kyselin do buněčné stěny.^{36, 40}

U **makrolidů**, hojně využívaných při léčbě infekcí dýchacích cest, je v poslední době také zjišťována významnější aktivita proti *M. tuberculosis* a v současnosti se budou zkoušet na léčbu MDR-TB. Konkrétně se jedná o dirithromycin, telithromycin, azithromycin a erythromycin; avšak podle WHO je jejich účinnost na *M. tuberculosis* zanedbatelná.³⁶

2.4 Průběh léčby

Léčba tuberkulózy je dlouhodobá, kombinovaná a kontrolovaná. Minimální účinná doba podávání antituberkulotik je 6 měsíců.¹⁴ Volba režimu léčby záleží na tom, zda se jedná o první setkání organismu s bakterií, či o recidivující infekci TB nebo vůči kterým léčivům je mykobakterie rezistentní.

Základní schéma terapie probíhá ve 2 stupních, první fáze (iniciální) je tvořena kombinací 4 léčiv v jedné ranní dávce, konkrétně isoniazidem, rifampicinem, ethambutolem a pyrazinamidem, případně mohou být doplněna ještě o streptomycin, a trvá přibližně 2 měsíce. Měla by probíhat za hospitalizace pacienta a jeho izolace až do doby prokázání nepřítomnosti bakterie kultivačním vyšetřením.⁴¹ Dále již v ambulantních podmínkách následuje přibližně po dobu 4 měsíců fáze pokračovací sestávající z dvojkombinace léčiv isoniazid/rifampicin, v případě většího rizika trojkombinace isoniazid/rifampicin/ethambutol.⁸ Načasování užívání těchto léčiv na ráno – konkrétně na lačno – je velmi důležité, neboť jejich vstřebávání může být sníženo vlivem přítomnosti potravy a nemusí tak být dosaženo požadovaného účinku.

2.5 Rezistence

Problém nastává u multirezistentní TB (MDR-TB), závažné formy vyvolané bakteriemi rezistentními na dvě nejúčinnější antituberkulotika rifampicin a isoniazid. Ještě větší komplikaci představuje extensivně rezistentní TB (XDR-TB), při které jsou mykobakterie rezistentní vůči rifampicinu, isoniazidu, jednomu z fluorochinolonů a injekčně podávanému léčivu z 2. linie (kanamycin, amikacin, kapreomycin).⁴²

Jakmile je u pacienta podezření na některý z typů rezistentní TB, musí být při volbě dalšího postupu léčby známá všechna doposud jím užívaná antituberkulotika – žádné z nich už by nemělo být součástí další terapie.

V případě MDR-TB by měly být do terapie nasazeny alespoň 4 léčiva z 2. linie (fluorochinolon + injekční léčivo 2. linie + orálně podávaná léčiva 2. linie; případně pyrazinamid), u XDR-TB jsou možnosti velmi omezené a volba léčiv individuální.⁴³

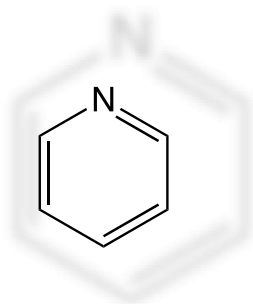
U rezistentních forem TB trvá léčba vzhledem k nízkému sterilizačnímu potenciálu dostupných léčiv 24 měsíců i déle^{11, 14} a ve spoustě procentech je neúspěšná, končící smrtí.

Mezi nejčastější příčiny vzniku rezistence patří neúplná, neadekvátní a nepravidelná léčba,³⁶ velkou roli může hrát i non-adherence pacienta k terapii.⁴⁴ Na růst počtu případů

rezistentní TB má do jisté míry vliv i úroveň zdravotnických systémů ve světě a samotná nákaza již rezistentními kmeny mykobakterií v populaci.⁴³

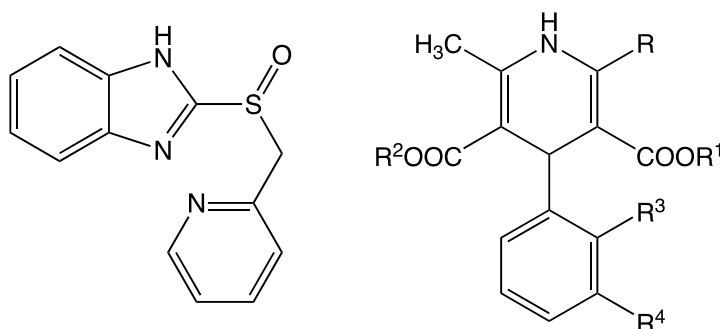
Zvyšující se rezistence vůči dosavadním léčivům, nutnost čtyř- až šesti-kombinační terapie, délka léčby a tím rostoucí noncompliance pacienta a výskyt mnohdy závažných nežádoucích účinků jsou důvodem snahy vyvinout nové molekuly účinné při léčbě tuberkulózy.⁴⁰

2.6 Pyridin ve strukturách léčiv



Pyridin je nejjednodušší dusíkatý šestičlenný heteroaromát, který má značný význam v mnoha oblastech přírodních věd – je důležitým rozpouštědlem, výchozí látkou pro reakce, součástí molekul desítek léčiv a v neposlední řadě důležitou strukturou spousty koenzymů a vitamínů.⁴⁵

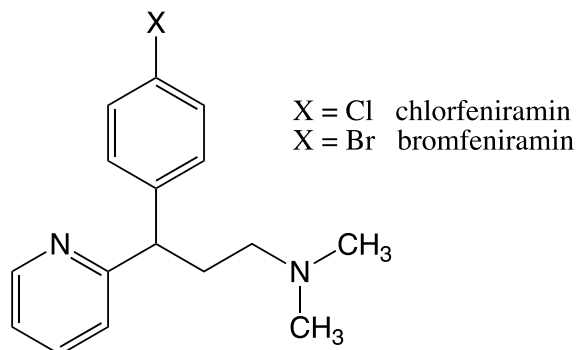
Příklad skupiny léčiv, ve které je pyridinové jádro podstatné pro účinek, nalezneme u antiulceróz – inhibitorů protonové pumpy (pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol, omeprazol). K benzimidazolovému základu je zde methylsulfinylovým můstkem vázán pyridinový kruh, protonizace jehož dusíku v parietálních buňkách v žaludku je mezistupeň pro vytvoření vlastní účinné formy léčiva.



Zleva 2-pyridinylmethylsulfinylbenzimidazoly; 1,4-dihydropyridiny

Další léčiva s tímto dusíkatým heterocyklem jsou využívána v léčbě arteriální hypertenze, u anginózních stavů a jako vazodilatancia. Jedná se o 1,4-dihydropyridiny, které fungují jako blokátory kalciových kanálů (např. nifedipin, amlodipin, nitrendipin, felodipin, lacidipin, isradipin, nimodipin aj.).

Zavedení pyridinu do molekul H₁ antihistaminik typu propylaminů přineslo podstatné zvýšení účinku. Jedná se například o chlorfeniramin, bromfeniramin či triprolidin, užívaných v případě výskytu alergických reakcí, na léčbu rhinitidy nebo zmírnění podráždění a svědění kůže při kopřivce.



Pyridin má zastoupení i ve strukturách protinádorových léčiv – příkladem může být mocetinostat, inhibitor histon deacetylázy (HDACi), který je v současné době předmětem klinického testování pro léčbu několika typů rakovin (akutní myeloidní leukémie, folikulárního lymfomu či Hodgkinova lymfomu) nebo imatinib působící inhibicí tyrosinkinázy, využívaný u chronické myeloidní leukémie.

Za povšimnutí stojí výzkum vědeckého týmu na Boloňské univerzitě, který se zabývá přípravou a hodnocením léčiv pro nádorová onemocnění kostí. Výchozími látkami syntézy jsou aminopyridiny/aminopyrimidiny a acylchloridy odvozené od kyseliny azelaové, pomocí Schotten-Baumannovy reakce pak vznikají produkty s amidovou vazbou (schéma č. 2).

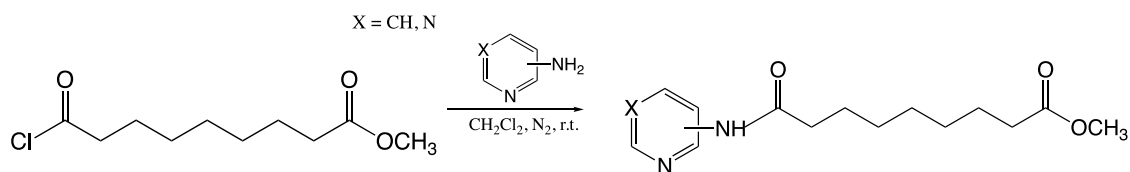
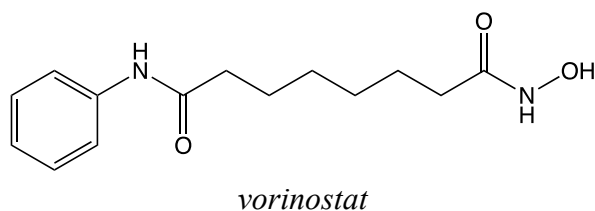


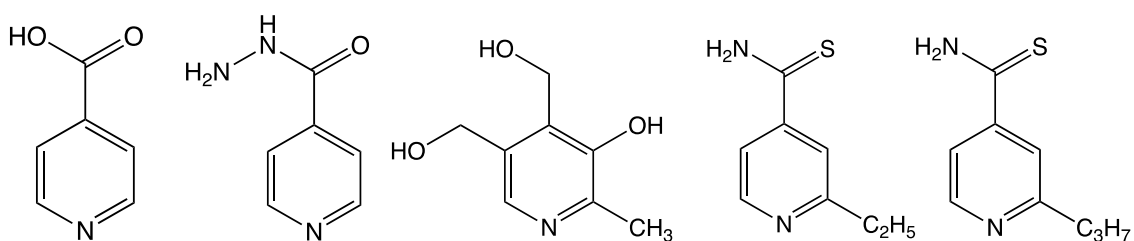
Schéma č. 2: Schotten-Baumannova reakce

Inspirací jim byla strukturální podobnost sloučenin s dříve připravenými HDACi, např. vorinostatem; ze série devíti připravených látek vykazovaly při hodnocení tři z nich významnější aktivitu.⁴⁵



Nás pro tuto práci nejvíce zajímá význam pyridinu ve strukturách léčiv tuberkulózy.

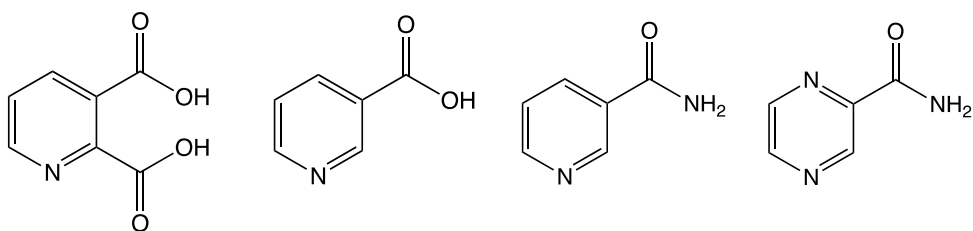
Hydrazid kyseliny isonikotinové, isoniazid, má jako základ pyridinový skelet a ten je nezbytný pro jeho aktivitu; obměny jiným cyklem se neosvědčily ani další substituce jádra nepřinesla efekt.⁴⁶ Strukturně se isoniazid velmi podobá vitamínu B₆, což zapříčiňuje jejich interakce – jednak se metabolity isoniazidu přímo váží na pyridoxin, čímž ho inaktivují, jednak samotný isoniazid inhibuje enzym pyridoxin fosfokinázu, který je nezbytný pro konverzi pyridoxinu na jeho účinnou formu pyridoxal-5-fosfát. Oba tyto mechanismy vedou k deficitu vitamínu B₆ a nutnosti jeho suplementace během léčby isoniazidem.⁴⁷



Zleva kyselina isonikotinová, isoniazid, pyridoxin, ethionamid, prothionamid

Další pyridinové deriváty využívané v léčbě TB jsou opět odvozené od kyseliny isonikotinové, jedná se o její thioamidy, konkrétně ethionamid a prothionamid. U těchto látek se osvědčila substituce malým alkylem v poloze 2 pyridinu.

Snahy připravit antimetabolit nikotinamidu, složky životně důležitého koenzymu NAD, vedly na základě strukturní podobnosti k objevu molekuly pyrazinamidu – nikotinamid neboli pyridin-3-karboxamid je karbanalogem pyrazinamidu a vzniká náhradou -OH v karboxylové skupině nikotinové kyseliny za amidovou skupinu -NH₂. Mononukleotid kyseliny nikotinové je v organismu vytvářen z kyseliny chinolinové působením enzymu fosforibosyltransferázy kyseliny chinolinové (QAPRTázy). Strukturní analogie pyrazinamidu a kyseliny chinolinové, je brána za klíčovou při inhibici QAPRTázy s následným narušením syntézy NAD.⁴⁸



Zleva kyselina chinolinová, kyselina nikotinová, nikotinamid, pyrazinamid

3. Experimentální část

3.1 Použité přístroje, chemikálie a metody

Syntéza všech sloučenin probíhala v laboratořích Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Veškeré chemikálie použité při přípravě sloučenin byly dodány od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), certifikované, v odpovídající kvalitě.

Meziprodukty a následně i výsledné produkty byly hodnoceny pomocí TLC chromatografie, za využití TLC desek Silica 60 F₂₅₄ (od společnosti Merck, Darmstadt, Německo) a UV boxu s UV lampou při vlnové délce 254 a 366 nm.

Pro čištění námi syntetizovaných látek jsme použili automatizovaný chromatograf puriFlash XS420Plus (Interchim, Montluçon, Francie) s originálními kolonami od stejného výrobce (nesférický silikagel, 30 μm). Eluce probíhala gradientově a pro detekci byl použit UV-VIS detektor měřící absorpenci při vlnových délkách 254 nm a 280 nm.

Měření ¹H-NMR a ¹³C-NMR spekter probíhalo na Katedře organické a bioorganické chemie pod záštitou doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. na přístroji Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, Kalifornie, USA) při frekvenci 500 MHz pro ¹H-NMR a 126 MHz pro ¹³C-NMR. Spektra byla změřena při laboratorní teplotě v deuterovaném chloroformu (CDCl₃) nebo deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*₆). Chemické posuny δ (ppm) jsou nepřímě vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) pomocí referenčních signálů konkrétního deuterovaného rozpouštědla – pro DMSO-*d*₆ 2,50 ppm v ¹H a 39,70 ppm v ¹³C spektru; pro CDCl₃ 7,27 ppm v ¹H a 77,00 ppm v ¹³C spektru.

IČ spektra byla měřena na Katedře organické a bioorganické chemie, spektrofotometricky přístrojem Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA), pomocí metody ATR (zeslabený úplný odraz) na krystalu germania.

Elementární analýza látek byla provedena analyzátozem Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Německo).

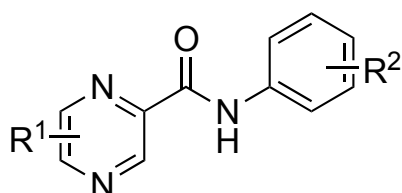
Teploty tání výsledných produktů byly změřeny v bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific, Staffordshire, Velká Británie) metodou otevřené kapiláry; odečtené hodnoty nejsou korigované.

Pro vytvoření vzorců finálních sloučenin, výpočet jejich teoretického prvkového složení a výpočet parametrů lipofility (log *P*, CLog *P*) byl použit program ChemDraw Professional 18.1 (PerkinElmer Informatics, Waltham, Massachusetts, USA).

Níže uvedené procentuální výtěžky reakcí jsou vztaženy na chromatograficky čistou látku po finálním přečištění.

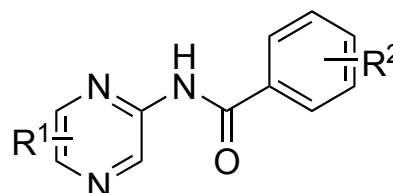
3.2 Princip přípravy produktů

Připravované deriváty *N*-pyridylbenzamidů jsou karbanaloga (záměna N-1 / N-4 v pyrazinovém kruhu za C) dříve nasyntetizovaných derivátů *N*-pyrazinylbenzamidů, které při testování *in vitro* vykazovaly určitou antimykobakteriální aktivitu. Tyto deriváty jsou retroamidy vzniklé obměnou spojovacího můstku v původně připraveném anlidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny, u kterého byla rovněž zjištěna antimykobakteriální aktivita.¹



N-fenylypyrazin-2-karboxamid

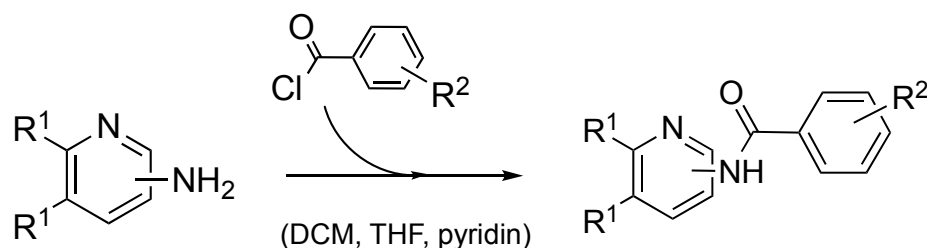
Mtb H37Rv: MIC = 2–20 μ M



N-pyrazinylbenzamid (retro amid)

Mtb H37Rv: MIC = 12–25 μ M

Při reakci dochází k acylaci vybraného aminopyridinu/chlorpyridin-2-aminu příslušným substituovaným benzoylchloridem (schéma č. 3). Reakce musí být chlazená k omezení vzniku *N,N*-diacylovaného produktu.



$R^1 = \text{H, Cl}$

$R^2 = \text{H, 2-Cl, 4-CH}_3$

Schéma č. 3: Reakční schéma acylace vybraného aminopyridinu/chlorpyridin-2-aminu

3.3 Obecný postup přípravy produktů

Ve 100 ml baňce s kulatým dnem jsme připravili směs bezvodého tetrahydrofuranu/dichlormethanu (4 ml) a bezvodého pyridinu (950 mg, 12 mmol, 3 mol eq) a na 15 minut ponořili zazátkované do ledu. Mezitím jsme smíchali vybraný benzoylchlorid (4,8 mmol, 1,2 eq) s bezvodým tetrahydrofuranem/dichlormethanem (10 ml) a po kapkách za stálého míchání přidávali k vychlazené směsi. Nakonec jsme rozpustili příslušný aminopyridin nebo chlorpyridin-2-amin (4 mmol, 1 eq) v bezvodém tetrahydrofuranu (4 ml) a po 10 minutovém míchání přikapali k předešlé směsi. V ledové lázni jsme reakční směs ponechali ještě 15 minut a poté jsme pokračovali v míchání při laboratorní teplotě.

Reakce byla hodnocena pomocí TLC s mobilní fází hexan:ethylacetát 2:1.

Pro čištění jednotlivých produktů jsme nejčastěji používali vakuovou odparku, na které jsme se po přidání toluenu zbavily přebytečného pyridinu, dále vytřepávání v děliče mezi vodu a ethylacetát, FLASH chromatografii (po adsorpci na silikagel, mobilní fáze tvořena hexanem a ethylacetátem, detekce sloučenin pomocí UV-VIS detektoru při vlnové délce 280 nm) a v případě potřeby dočištění látek se nám osvědčila rekrystalizace horkým ethanolem nebo převrstvení látky trochou hexanu a ponoření filtračního papíru na vytažení zbytkových nečistot.

Konečné produkty byly charakterizovány teplotou tání, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopii, IČ spektroskopii a elementární analýzou.

3.4 Dodatečná izolace volných bazí z jejich hydrochloridů

U sloučenin JZ-EV4, JZ-EV-9 a JZ-EV12 výsledky elementární analýzy prvních vzorků neodpovídaly chemickému složení volných bazí. NMR spektra těchto sloučenin se však zdála být v pořádku. Při pokusech o přečištění těchto sloučenin jsme si všimli, že jsou výrazně rozpustnější ve vodě než ostatní sloučeniny z dané série. To nás přivedlo k myšlence, že izolované sloučeniny mohou být soli, vzhledem ke způsobu provedení syntéz pravděpodobně hydrochloridy.

Výsledky prvotní elementární analýzy sloučenin JZ-EV4 a JZ-EV12 (v tabulkách níže označeno jako „vzorek 1“) skutečně odpovídaly čistým hydrochloridům. U sloučeniny JZ-EV9 výsledky prvotní elementární analýzy neodpovídaly ani volné bazi, ani čistému hydrochloridu – pravděpodobně se jednalo o směs s vyšším podílem anorganické složky.

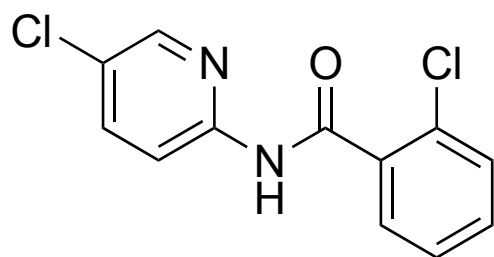
Pro získání volnýchází sloučenin JZ-EV4, JZ-EV9 a JZ-EV12 jsme použili následující postup.

Hydrochlorid byl vložen do kádinky a rozpuštěn přibližně ve 30 ml směsi ethanol-voda (1:1, v/v). Za stálého míchání byl k roztoku po malém množství přidáván pevný uhličitan sodný dekahydrát za kontroly univerzálním indikátorovým papírkem až do mírně bazické reakce (přibližné pH 8–9). Rozpouštědla byla poté odpařena za sníženého tlaku. Pevný zbytek byl rozmísen ve 30 ml EtOAc a směs byla v dělicí nálevce protřepána vodou (2–3x 30 ml). Organické podíly byly poté vysušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. tímto postupem byly získány čisté volné baze, které jsou v tabulkách v části 3.5 označeny jako „vzorek 2“ a v tabulce č. 1 přídomkem „B“.

Sloučeniny JZ-EV4 a JZ-EV12 byly podrobeny biologickému testování jako hydrochloridy i volné baze, sloučenina JZ-EV9 pouze jako volná baza.

3.5 Nově připravené sloučeniny

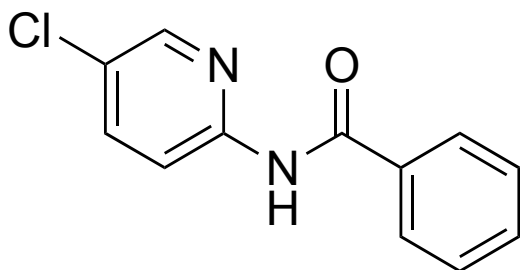
JZ-EV 1 2-chlor-*N*-(5-chlorpyridin-2-yl)benzamid



CAS: 300670-32-0

Sumární vzorec	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₂ O
Molekulová hmotnost	267,11
Log <i>P</i>	3,33
Clog <i>P</i>	2,717
Teplota tání	152,5–154,1 °C
Výtěžek reakce	<ul style="list-style-type: none">• Teoretický 1068 mg• Praktický 392 mg (37 %)
Elementární analýza	<ul style="list-style-type: none">• Vypočteno C: 53,96; H: 3,02; Cl: 26,54; N: 10,49; O: 5,99• Nalezeno C: 53,99; H: 2,96; N: 10,32
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 9.57 (bs, 1H, CONH), 8.39 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, pyridin), 7.74–7.65 (m, 3H, ArH), 7.49–7.35 (m, 3H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.12, 149.71, 146.20, 138.22, 134.97, 131.96, 130.98, 130.41, 129.77, 127.21, 127.02, 115.12.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3227 (v, NH); 3064; 3021; 2919; 2850; 1679 (v, C=O, amid); 1579; 1521; 1461; 1378; 1304; 1281; 1114; 1016; 839; 750; 632

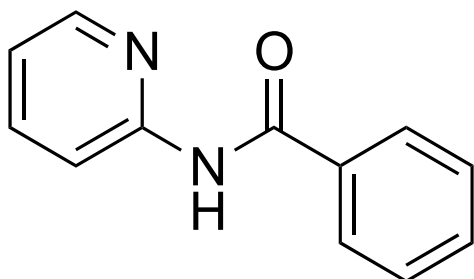
JZ-EV 2 *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)benzamid



CAS: 258338-66-8

Sumární vzorec	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	232,67
Log <i>P</i>	2,78
Clog <i>P</i>	2,809
Teplota tání	120,5–123,7 °C
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	<p>930,2 mg</p> <p>392 mg (42 %)</p>
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	<p>C: 61,95; H: 3,90; Cl: 15,24; N: 12,04; O: 6,88</p> <p>C: 61,77; H: 3,66; N: 12,01</p>
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.78 (bs, 1H, CONH), 8.39 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, pyridin), 8.17 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, pyridin), 7.94–7.88 (m, 2H, H2', H6'), 7.72 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.5 Hz, 1H, pyridin), 7.61–7.56 (m, 1H, H4'), 7.53–7.47 (m, 2H, H3', H5').
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.66, 149.89, 146.52, 138.05, 133.96, 132.40, 128.86, 127.20, 126.85, 114.81.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3231 (ν, NH); 1675 (ν, C=O, amid); 1577; 1522; 1489; 1461; 1378; 1304; 1260; 1107; 1011; 842; 715; 696; 658; 630

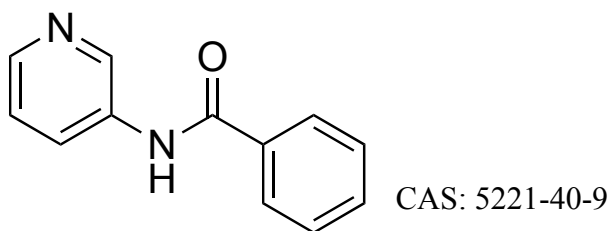
JZ-EV 3 *N*-(pyridin-2-yl)benzamid



CAS: 4589-12-2

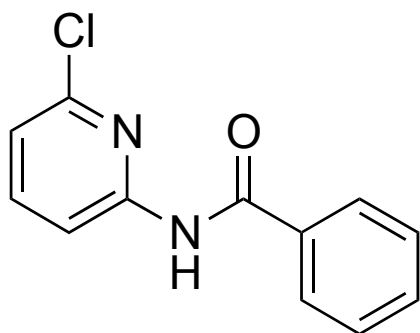
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O
Molekulová hmotnost	198,23
Log <i>P</i>	2,22
Clog <i>P</i>	1,981
Teplota tání	75,6–78,4 °C, dle literatury 73–75 °C ⁴⁹
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	792 mg 50,5 mg (6 %)
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	C: 72,71; H: 5,09; N: 14,13; O: 8,07 C: 72,78; H: 4,90; N: 13,59
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.90 (bs, 1H, CONH), 8.43–8.40 (m, 1H, pyridin), 8.25–8.22 (m, 1H, pyridin), 7.97–7.92 (m, 2H, H2', H6'), 7.80–7.73 (m, 1H, pyridin), 7.60–7.55 (m, 1H, ArH), 7.53–7.47 (m, 2H, H3', H5'), 7.09–7.04 (m, 1H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.81, 151.61, 147.82, 138.48, 134.30, 132.20, 128.79, 127.23, 119.89, 114.23.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3170 (v, NH); 3024; 1670 (v, C=O, amid); 1579; 1527; 1433; 1302; 1278; 775; 722; 695; 678

JZ-EV 4 *N*-(pyridin-3-yl)-benzamid



Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O volná base; C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O hydrochlorid
Molekulová hmotnost	198,23 volná base; 234,68 hydrochlorid
Log <i>P</i>	1,5 base
Clog <i>P</i>	1,981 base
Teplota tání	vzorek 1 - 222,2–225,3 °C hydrochlorid; vzorek 2 - 109,1–114,6 °C volná base, dle lit. 116–117 °C 50
Výtěžek reakce <ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	939 mg hydrochloridu 736,2 mg (78 %) hydrochloridu Po přečištění získáno 593 mg volné base.
Elementární analýza <ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	C: 72,71; H: 5,09; N: 14,13; O: 8,07 volná base C: 61,42; H: 4,72; N: 11,94; O: 6,82; Cl: 15,11 hydrochlorid vzorek 1 - C: 61,67; H: 4,54; N: 12,01 -> hydrochlorid vzorek 2 - C: 72,25; H: 4,93; N: 13,95 -> volná base
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.45 (bs, 1H, CONH), 8.94 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, pyridin), 8.31 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.5 Hz, 1H, pyridin), 8.22–8.18 (m, 1H, pyridin), 8.00–7.96 (m, 2H, H2', H6'), 7.64–7.58 (m, 1H, H4'), 7.57–7.52 (m, 2H, H3', H5'), 7.41–7.37 (m, 1H, pyridin). – volná base
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166.12, 144.74, 142.19, 136.01, 134.55, 132.04, 128.63, 127.90, 127.48, 123.68. – volná base
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3325 (v, NH); 3054; 1647 (v, C=O, amid); 1591; 1522; 1479; 1418; 1333; 1284; 1027; 795; 722; 704; 695; 658

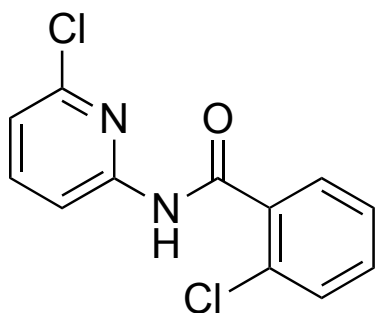
JZ-EV 5 *N*-(6-chlorpyridin-2-yl)benzamid



CAS: 1545221-49-5

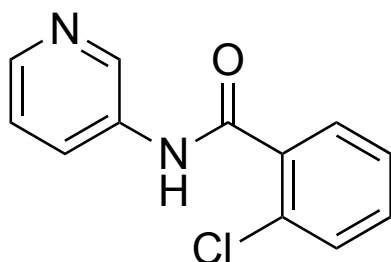
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	232,67
Log <i>P</i>	3,12
Clog <i>P</i>	2,809
Teplota tání	46,4–48,2 °C
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	<p>930,2 mg</p> <p>321,5 mg (35 %)</p>
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	<p>C: 61,95; H: 3,90; Cl: 15,24; N: 12,04; O: 6,88</p> <p>C: 62,18; H: 3,79; N: 11,85</p>
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.64 (bs, 1H, CONH), 8.32 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H, ArH), 7.92–7.88 (m, 2H, ArH), 7.70 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.60–7.55 (m, 1H, ArH), 7.52–7.45 (m, 2H, ArH), 7.09 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.55, 151.32, 148.93, 140.98, 133.64, 132.46, 128.83, 127.16, 119.80, 112.13.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3300 (v, NH); 2920; 1664 (v, C=O, amid); 1570; 1528; 1492; 1432; 1390; 1302; 1263; 1246; 1160; 782; 702; 689; 663

JZ-EV 6 2-chlor-*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)benzamid



CAS: 1713531-88-4

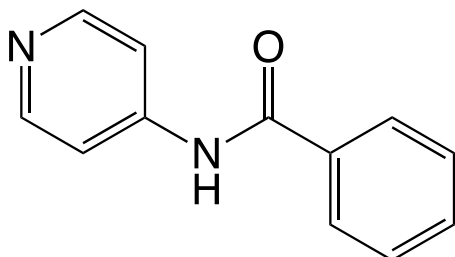
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₂ O
Molekulová hmotnost	267,11
Log <i>P</i>	3,68
Clog <i>P</i>	2,717
Teplota tání	89,3–95,8 °C
Výtěžek reakce	<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický 1067,9 mg • Praktický 684,3 mg (64 %)
Elementární analýza	<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno C: 53,96; H: 3,02; Cl: 26,54; N: 10,49; O: 5,99 • Nalezeno C: 54,11; H: 2,72; N: 10,41
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.64 (bs, 1H, CONH), 8.31 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.76–7.68 (m, 2H, ArH), 7.48–7.40 (m, 2H, ArH), 7.39–7.35 (m, 1H, ArH), 7.11 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 164.80, 150.85, 149.12, 141.04, 134.33, 132.12, 130.90, 130.55, 129.93, 127.22, 120.23, 112.29.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3338; 3173 (v, NH); 3029; 1684 (v, C=O, amid); 1573; 1525; 1433; 1394; 1300; 1281; 1242; 1163; 1124; 790; 729; 684



CAS: 31639-05-1

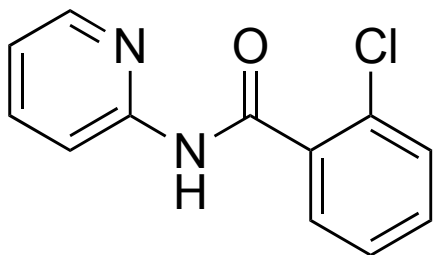
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	232,67
Log <i>P</i>	2,06
Clog <i>P</i>	1,935
Teplota tání	124,1–127,6 °C, dle literatury 138–138,5 °C ⁵¹
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	929,6 mg 66 mg (7 %)
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	C: 61,95; H: 3,90; Cl: 15,24; N: 12,04; O: 6,88 C: 61,24; H: 3,02; N: 7,25 (nedostatečná čistota)
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.91 (s, 1H, CONH), 8.96 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H, pyridin), 8.40 (dd, <i>J</i> = 4.9, 1.5 Hz, 1H, pyridin), 8.28–8.24 (m, 1H, pyridin), 7.79–7.76 (m, 1H, pyridin), 7.67–7.38 (m, 4H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 169.18, 149.44, 149.33, 136.06, 135.00, 134.92, 131.72, 130.75, 129.89, 129.30, 126.94, 123.81.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): (ν, NH); 2928; 1667 (ν, C=O, amid); 1344; 1276; 1237; 1155; 901; 770; 748; 708; 697; 644

JZ-EV 9 *N*-(pyridin-4-yl)benzamid



CAS: 5221-44-3

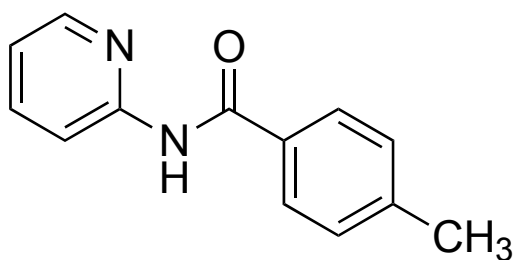
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O volná base; C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O hydrochlorid
Molekulová hmotnost	198,23 volná base; 234,68 hydrochlorid
Log <i>P</i>	1,5 base
Clog <i>P</i>	1,981 base
Teplota tání	vzorek 1 - >270 °C, látka zhrudkovatěla, hydrochlorid vzorek 2 - 201,1–204,5 °C za rozkladu, volná base, dle literatury 208–210 °C ⁵²
Výtěžek reakce	<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický 937,6 mg hydrochloridu • Praktický 205,3 mg (22 %) hydrochloridu Po přečištění získáno 58 mg volné base.
Elementární analýza	<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno C: 72,71; H: 5,09; N: 14,13; O: 8,07 volná base C: 61,42; H: 4,72; N: 11,94; O: 6,82; Cl: 15,11 hydrochlorid • Nalezeno vzorek 1 - C: 48,46; H: 3,72; N: 9,50 -> neznámá směs s anorganickým podílem vzorek 2 - C: 71,10; H: 4,76; N: 13,95 -> volná base
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.59 (bs, 1H, CONH), 8.50–8.45 (m, 2H, pyridin), 7.99–7.94 (m, 2H, pyridin), 7.82–7.77 (m, 2H, H2', H6'), 7.65–7.60 (m, 1H, H4'), 7.58–7.52 (m, 2H, H3', H5'). – volná base
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166.67, 150.47, 146.11, 134.43, 132.27, 128.67, 128.02, 114.17. – volná base
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 1677 (v, C=O, amid); 1590; 1507; 1417; 1329; 1294; 1211; 826; 713; 640



CAS: 54979-78-1

Sumární vzorec	C ₁₂ H ₉ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	232,67
Log <i>P</i>	2,78
Clog <i>P</i>	1,935
Teplota tání	133,2–139,1 °C, dle literatury 135–137 °C ⁵³
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	929,6 mg 266,2 mg (29 %)
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	C: 61,95; H: 3,90; Cl: 15,24; N: 12,04; O: 6,88 C: 61,63; H: 3,53; N: 11,58
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 9.66 (bs, 1H, CONH), 8.40 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H, pyridin), 7.89–7.84 (m, 1H, ArH), 7.78–7.71 (m, 1H, ArH), 7.71–7.66 (m, 1H, ArH), 7.45–7.39 (m, 2H, ArH), 7.38–7.33 (m, 1H, ArH), 7.01–6.95 (m, 1H, ArH).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.25, 151.41, 147.49, 138.56, 135.31, 131.65, 131.02, 130.38, 129.75, 127.12, 120.02, 114.53.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3173; 3118 (v, NH); 2987; 1679 (v, C=O, amid); 1578; 1536; 1434; 1310; 1282; 1051; 772; 750; 711; 608

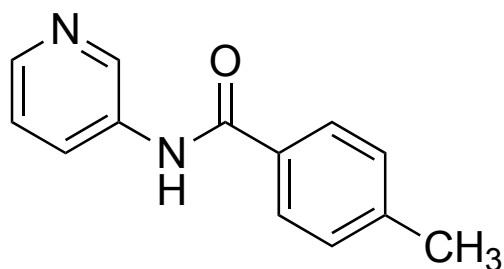
JZ-EV 11 4-methyl-*N*-(pyridin-2-yl)benzamid



CAS: 14547-80-9

Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O
Molekulová hmotnost	212,25
Log <i>P</i>	2,71
Clog <i>P</i>	2,48
Teplota tání	99,5–103,4 °C, dle literatury 101–103 °C ⁵³
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	848 mg 161,6 mg (19 %)
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	C: 73,56; H: 5,70; N: 13,20; O: 7,54 C: 73,78; H: 5,33; N: 12,88
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.78 (bs, 1H, CONH), 8.43–8.38 (m, 1H, pyridin), 8.28–8.25 (m, 1H, pyridin), 7.84 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, benzen), 7.78–7.73 (m, 1H, pyridin), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 2H, benzen), 7.08–7.04 (m, 1H, pyridin), 2.43 (s, 3H, CH ₃).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.67, 151.68, 147.80, 142.83, 138.44, 131.39, 129.46, 127.24, 119.77, 114.17, 21.49.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3234 (ν, NH); 3055; 1670 (ν, C=O, amid); 1578; 1537; 1435; 1309; 1268; 1241; 774; 748; 725; 697; 616

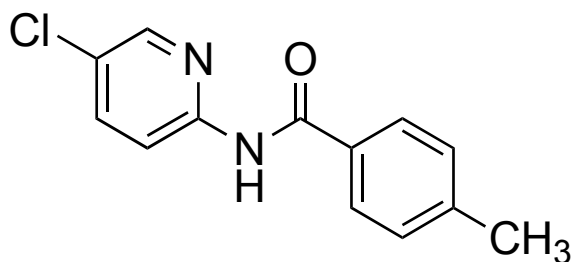
JZ-EV 12 4-methyl-*N*-(pyridin-3-yl)benzamid



CAS: 33543-23-6

Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O volná base; C ₁₃ H ₁₃ ClN ₂ O hydrochlorid
Molekulová hmotnost	212,25 volná base; 248,71 hydrochlorid
Log <i>P</i>	1,99 base
Clog <i>P</i>	2,48 base
Teplota tání	vzorek 1 - 270,2–276,5 °C, látka uhelnatí, hydrochlorid; vzorek 2 - 126,9–129,0 °C, volná base, dle literatury 126,5 °C ⁵⁴
Výtěžek reakce	<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický 993,7 mg hydrochloridu • Praktický 838,8 mg (84 %) hydrochloridu Po přečištění získáno 576 mg volné base.
Elementární analýza	<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno C: 73,56; H: 5,70; N: 13,20; O: 7,54 volná base C: 62,78; H: 5,27; N: 11,26; O: 7,16; Cl: 7,93 hydrochlorid • Nalezeno vzorek 1 - C: 62,76; H: 4,95; N: 11,28 -> hydrochlorid vzorek 2 - C: 73,51; H: 5,49; N: 13,21 -> volná base
¹ H NMR	(500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.35 (s, 1H, CONH), 8.94 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, pyridin), 8.30 (dd, <i>J</i> = 4.7, 1.5 Hz, 1H, pyridin), 8.19 (ddd, <i>J</i> = 8.3, 2.6, 1.5 Hz, 1H, pyridin), 7.93–7.87 (m, 2H, H2', H6'), 7.41–7.32 (m, 3H, pyridin, H3', H5'), 2.38 (bs, 3H, CH ₃). – volná base
¹³ C NMR	(126 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 165.90, 144.61, 142.17, 142.13, 136.08, 131.64, 129.15, 127.94, 127.44, 123.65, 21.19. – volná base
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3323 (v, NH); 2971; 1652 (v, C=O, amid); 1529; 1481; 1290; 804; 750; 709; 667

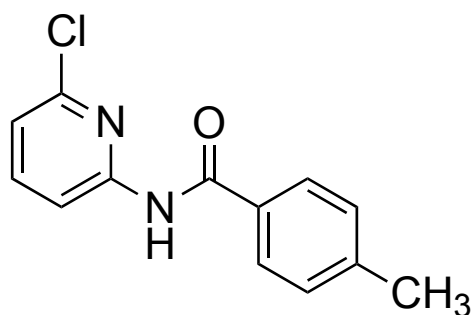
JZ-EV 13 *N*-(5-chlorpyridin-2-yl)-4-methylbenzamid



CAS: 335420-09-2

Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	246,69
Log <i>P</i>	3,26
Clog <i>P</i>	3,308
Teplota tání	127,3–132,3 °C
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> Teoretický Praktický 	986,3 mg 460,5 mg (47 %)
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> Vypočteno Nalezeno 	C: 63,29; H: 4,49; Cl: 14,37; N: 11,36; O: 6,49 C: 63,42; H: 4,10; N: 11,25
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.69 (bs, 1H, CONH), 8.39 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz, 1H, pyridin), 8.18 (d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H, pyridin), 7.81 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H2', H6'), 7.71 (dd, <i>J</i> = 8.9, 2.6 Hz, 1H, pyridin), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H, H3', H5'), 2.43 (s, 3H, CH ₃).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.56, 149.99, 146.49, 143.10, 138.01, 131.07, 129.53, 127.21, 126.71, 114.76, 21.51.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3244 (ν, NH); 3065; 1679 (ν, C=O, amid); 1575; 1530; 1507; 1376; 1297; 1103; 837; 747; 721; 602

JZ-EV 14 *N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-4-methylbenzamid



CAS: 1713531-87-3

Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₁ ClN ₂ O
Molekulová hmotnost	246,69
Log <i>P</i>	3,61
Clog <i>P</i>	3,308
Teplota tání	106,0–107,9 °C
Výtěžek reakce	
<ul style="list-style-type: none"> • Teoretický • Praktický 	<p>986,3 mg</p> <p>479 mg (49 %)</p>
Elementární analýza	
<ul style="list-style-type: none"> • Vypočteno • Nalezeno 	<p>C: 63,29; H: 4,49; Cl: 14,37; N: 11,36; O: 6,49</p> <p>C: 63,25; H: 4,30; N: 11,35</p>
¹ H NMR	(500 MHz, CDCl ₃) δ 8.53 (bs, 1H, CONH), 8.33 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H, pyridin), 7.82–7.78 (m, 2H, H2', H6'), 7.71 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H, pyridin), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H, H3', H5'), 7.10–7.08 (m, 1H, pyridin), 2.43 (s, 3H, CH ₃).
¹³ C NMR	(126 MHz, CDCl ₃) δ 165.45, 151.44, 148.94, 143.22, 140.96, 130.81, 129.54, 127.19, 119.67, 112.07, 21.49.
IČ spektrum	(ATR-Ge, cm ⁻¹): 3292 (v, NH); 1655 (v, C=O, amid); 1570; 1535; 1506; 1408; 1389; 1301; 1266; 1244; 1161; 1113; 794; 743

3.6 Biologické testování látek

3.6.1 Antimykobakteriální aktivita

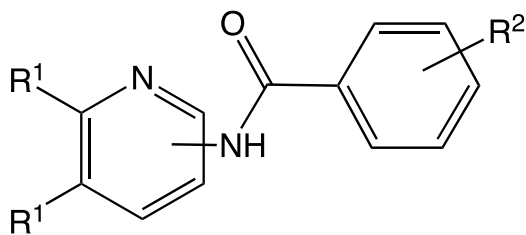
In vitro testování námi připravených látek probíhalo na Katedře lékařských a biologických věd Farmaceutické fakulty pod vedením PharmDr. Ondřeje Jand'ourka, Ph.D.

U všech látek byla zkoušena *in vitro* aktivita vůči *Mycobacterium smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *Mycobacterium aurum* DSM 43999 (ATCC 23366), dodaných z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo); dále bylo testování prováděno na avirulentním kmenu *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ITM-M006710 (ATCC 9431) získaném z Belgických koordinovaných sbírek mikroorganismů.

Stanovení antimykobakteriální aktivity proběhlo mikrodiluční metodou za využití 96-jamkové mikrotitrační destičky, přičemž jednotlivé jamky obsahovaly roztok zkoušené látky příslušné koncentrace, živné médium a naočkovaný kmen mykobakterií. Kultivační médium bylo tvořeno bujónem Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) obohaceným 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich) a 10 % růstového doplňku Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, India), který obsahoval kyselinu olejovou, albumin, dextrózu a katalasu. Testované látky rozpuštěné v DMSO byly naředěné dvojkovým ředěním tak, že jejich výsledné koncentrace v jamkách, po přidání mykobakteriální suspenze, byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 µg/ml. Jako standardy pro vyhodnocení aktivity byly použity isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich). Zároveň byla provedena pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontrola.

Mikrotitrační destička byla inkubována ve tmě při 37 °C bez třepání (*M. smegmatis* po dobu 2 dnů, *M. aurum* 3 dnů a *M. tuberculosis* 5 dnů). Poté byla do jamek přidána směs 0,02% roztoku sodné soli resazurinu a 10% vodného roztoku Tweenu 80, následovala opět inkubace (*M. smegmatis* 2,5 hod, *M. aurum* 4 hod a *M. tuberculosis* 24 hod). Po uplynutí těchto dob byla na základě barevných změn stanovena antimykobakteriální aktivita (tabulka č. 1), vyjádřená jako minimální inhibiční koncentrace MIC – totiž nejnižší koncentrace látky, která zabrání přeměně modré barvy na růžovou (indikující růst mykobakterií).

Tabulka č. 1: Výsledky testování antimykobakteriální aktivity vyjádřené jako MIC ($\mu\text{g/ml}$) nově připravených látek v porovnání se standardy. Sloučeniny jsou srovnány dle substituce na pyridinovém jádře.



Obečná struktura testovaných látek

	Pyridin	R ²	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>Mtb H37Ra</i>
JZ-EV 3	2-NH ₂	H	250	≥ 500	250
JZ-EV 10	2-NH ₂	2-Cl	≥ 500	≥ 500	≥ 500
JZ-EV 11	2-NH ₂	4-CH ₃	62,5	125	125
JZ-EV 4*	3-NH ₂	H	250	≥ 500	≥ 500
JZ-EV 4B**	3-NH ₂	H	125	250	250
JZ-EV 7	3-NH ₂	2-Cl	125	≥ 500	500
JZ-EV 12*	3-NH ₂	4-CH ₃	125	250	250
JZ-EV 12B**	3-NH ₂	4-CH ₃	250	250	125
JZ-EV 9B**	4-NH ₂	H	250	≥ 500	250
JZ-EV 2	2-NH ₂ -5-Cl	H	62,5	≥ 500	≥ 500
JZ-EV 1	2-NH ₂ -5-Cl	2-Cl	≥ 500	≥ 500	≥ 500
JZ-EV 13	2-NH ₂ -5-Cl	4-CH ₃	≥ 500	≥ 500	≥ 500
JZ-EV 5	2-NH ₂ -6-Cl	H	125	≥ 500	125
JZ-EV 6	2-NH ₂ -6-Cl	2-Cl	62,5	250	62,5
JZ-EV 14	2-NH ₂ -6-Cl	4-CH ₃	31,25	≥ 500	15,625
INH	-	-	7,81–15,625	3,91	0,25
RIF	-	-	1,56–12,5	0,39–0,78	0,0015625–0,0039
CPX	-	-	0,0625–0,125	0,015625–0,03125	0,125–0,25

* hydrochlorid; ** volná base

3.6.2 *In vitro* cytotoxicita

U všech připravených sloučenin byla hodnocena *in vitro* cytotoxicita k rozlišení specifického působení a nespecifického cytotoxického účinku. Testování bylo provedeno v laboratořích Katedry farmakologie a toxikologie léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové s využitím kolorimetrické metody CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96; PROMEGA, Fitchburg, USA).

Pro hodnocení cytotoxicity byla použita hepatocelulární buněčná linie HepG2 karcinomu lidských jater dodaná od Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK). Kultivace buněk HepG2 probíhala v mediu MEM – Minimum Essentials Eagle Medium (Sigma-Aldrich) s 10 % fetálního hovězího séra (PAA Laboratories, Pasching, Austria), 1 % L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a roztokem neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich) ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5 % CO₂ při 37°C.

Pro subkultivaci byly použity buňky po ošetření trypsinem/EDTA (Sigma-Aldrich) při 37 °C.

Nejprve byly buňky nasazeny do 96-jamkové destičky v hustotě 10 000 na jednu jamku. Po 24 hodinách byly k buňkám přidány jednotlivé testované látky rozpuštěné v DMSO. Podle rozpustnosti konkrétních sloučenin byly koncentrace těchto látek v rozmezí 1–1000 µM. Současně byla na destičku aplikována pozitivní kontrola (100% životnost buněk) a negativní kontrola (100% toxicita, buňky s 10% DMSO). Vše bylo uskutečněno ve třech opakováních. Po 24 hodinách kultivace ve zvlhčené atmosféře s obsahem 5 % CO₂ při 37 °C bylo přidáno činidlo ze sady CellTiter 96[®]. Následovaly další 2 hodiny inkubace při 37 °C, po jejichž uplynutí byla měřena absorbance při vlnové délce 490 nm (TECAN, Infinite M200, Austria).

Pro závěrečné vyhodnocení cytotoxicity tvořily experimentální skupinu buňky ošetřené zkoušenými látkami, kontrolní skupinou byly látkami neošetřené HepG2 buňky.

Výsledky byly vyjádřeny jako inhibiční koncentrace IC₅₀, tj. koncentrace sloučeniny vedoucí ke snížení viability buněk o 50 % oproti kontrole (tabulka č. 2). Hodnota IC₅₀ byla vypočtena nelineární regresí z inhibičních křivek (graf závislosti procentuální viability buněk na koncentraci zkoušených látek) pomocí softwaru GraphPad Prism 8. Vybrané inhibiční křivky testovaných látek jsou uvedeny níže (obr. č. 3).

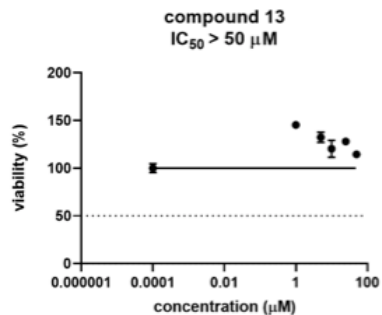
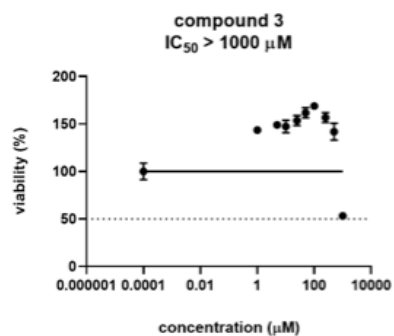
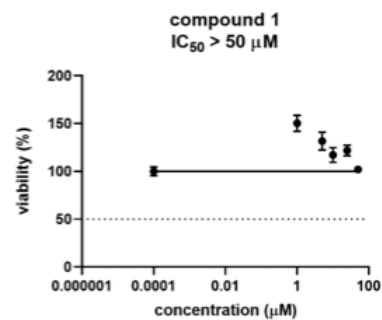
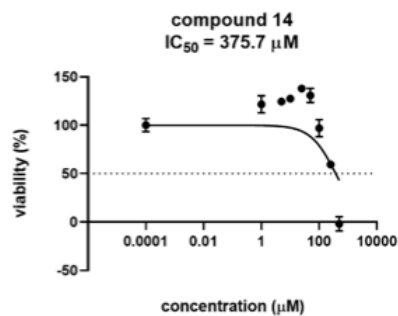
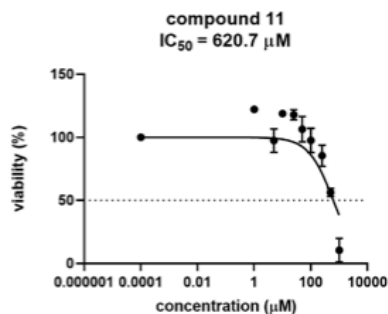
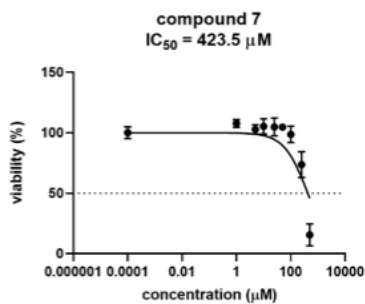
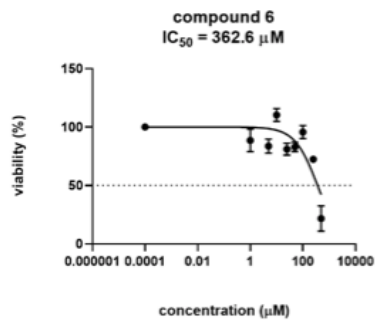
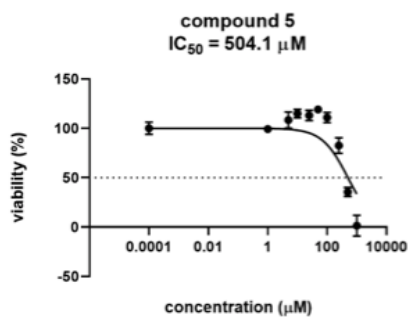
Tabulka č. 2: *In vitro* cytotoxicita testovaných látek měřená na buněčné linii HepG2

Testované sloučeniny	IC ₅₀ (μM)	Rozmezí koncentrací (μM)
JZ-EV 1	>50*	1–1000
JZ-EV 2	>250*	1–1000
JZ-EV 3	>1000**	1–1000
JZ-EV 4	>1000**	1–1000
JZ-EV 5	504,1	1–1000
JZ-EV 6	362,6	1–1000
JZ-EV 7	423,5	1–1000
JZ-EV 9	>500*	1–1000
JZ-EV 10	>500*	1–1000
JZ-EV 11	620,7	1–1000
JZ-EV 12	>1000**	1–1000
JZ-EV 13	>50*	1–1000
JZ-EV 14	375,7	1–1000

* stanovení IC₅₀ při vyšší koncentraci látek nebylo možné kvůli jejich vysrážení v buněčném kultivačním médiu

** hodnoty IC₅₀ byly nad limitem testované koncentrace

Omezená rozpustnost sloučenin JZ-EV 1, JZ-EV 2, JZ-EV 9, JZ-EV 10, JZ-EV 13 v buněčném kultivačním médiu neumožnila stanovení IC₅₀; hodnoty IC₅₀ těchto sloučenin jsou značně vyšší než nejvyšší naměřená koncentrace (50, 250 a 500 μM). Dle průběhu inhibičních křivek lze v testovaném koncentračním rozmezí předpokládat absenci cytotoxicity u látek JZ-EV 1, JZ-EV 10 a JZ-EV 13. Za sloučeniny bez toxického účinku můžeme pokládat i JZ-EV 3, JZ-EV 4, JZ-EV 12, jejichž hodnoty IC₅₀ jsou nad limitem nejvyšší testované koncentrace (1000 μM). Naopak určitý stupeň cytotoxicity vykazují látky JZ-EV 5, JZ-EV 6, JZ-EV 7, JZ-EV 11 a JZ-EV 14.



Obr. č. 3: Cytotoxický efekt různých koncentrací vybraných látek na buňky HepG2

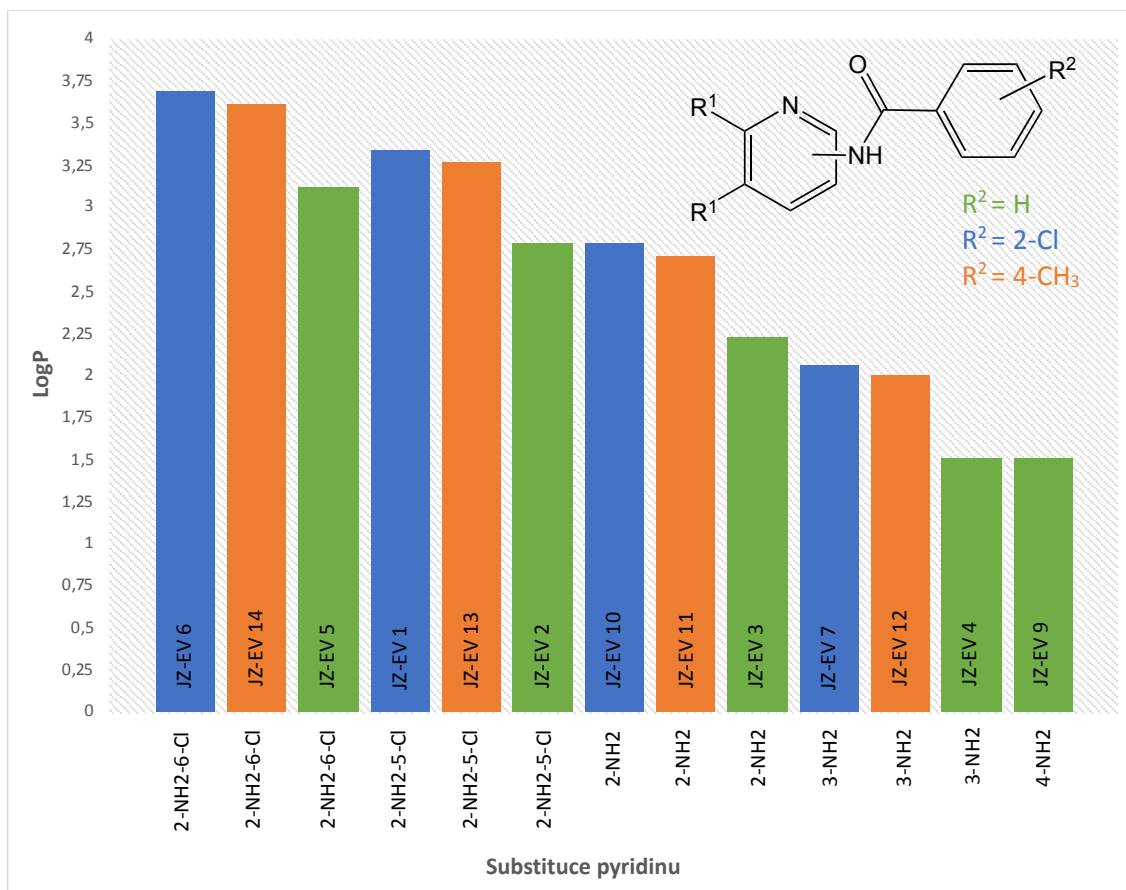
4. Diskuze

Předmětem diplomové práce byla syntéza a následné hodnocení biologické aktivity derivátů *N*-pyridylbenzamidů. Výchozí aminopyridiny nebo chlorpyridin-2-aminy byly acylovány substituovanými benzoylchloridy za vzniku *N*-acylovaných sloučenin. V rámci této práce bylo nasyntetizováno 13 látek (4 nové, v literatuře dosud nepopsané látky a dalších 9 s vydanou publikací, ne však na vyhodnocení antimykobakteriálního účinku), které tvoří pouze část rozsáhlejší série derivátů připravovaných na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy doktorandkou Dariou Nawrot.

Výtěžky chromatograficky čistých produktů se pohybovaly v rozmezí 6–84 %, průměrný výtěžek je zhruba 39,9 %. K největším ztrátám docházelo zejména při přečišťování; u některých látek stačila FLASH chromatografie, zatímco u jiných bylo zapotřebí i dalších čistících kroků, např. vytřepávání v dělicí nálevce nebo rekrystalizace z horkého ethanolu.

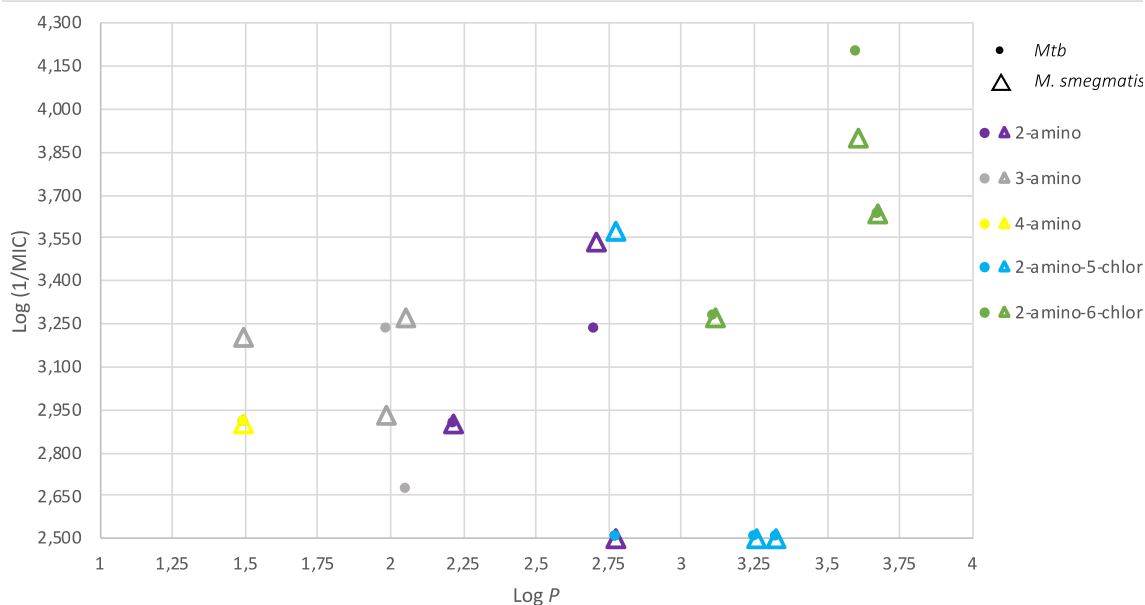
Pro potvrzení totožnosti a čistoty konečných produktů byla provedena charakterizace ^1H a ^{13}C NMR, IČ spektry a elementární analýzou. Dalším vodítkem pro identifikaci struktur bylo měření teploty tání a následné porovnání odečtených hodnot s dostupnými údaji v literatuře. Všechny připravené sloučeniny jsou pevné látky, bílé, případně lehce nažloutlé barvy, bez zápachu.

Pomocí chemického programu ChemDraw Professional 18.1 byly určeny další charakteristiky struktur, konkrétně sumární vzorce, molekulové hmotnosti, teoretické prvkové složení, hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$. Poslední dva zmiňované parametry vypovídají o lipofilitě sloučenin, která je důležitým ukazatelem pro předpověď, zda bude daná látka snadno pronikat přes lipofilní buněčnou stěnu mykobakterie. Platí, že čím je hodnota vyšší, tím lipofilnější sloučenina je, zároveň by ale dle pravidel Lipinského neměla přesahovat 5. Hodnoty $\log P$ našich látek se pohybovaly v rozmezí 1,50 až 3,68; pro $\text{Clog } P$ byly vypočítané hodnoty mezi 1,935 až 3,308. Obecně vyšší lipofilitu vykazovaly struktury odvozené od chlorpyridin-2-aminů, což je názorně zobrazeno na grafu (graf č. 1). Nejlipofilnější sloučeninou z připravené série látek je JZ-EV 6 ($\log P = 3,68$), totiž 2-chlor-*N*-(6-chlorpyridin-2-yl)benzamid; téměř srovnatelnou hodnotu $\log P = 3,61$ má i *N*-(6-chlorpyridin-2-yl)-4-methylbenzamid (JZ-EV 14).



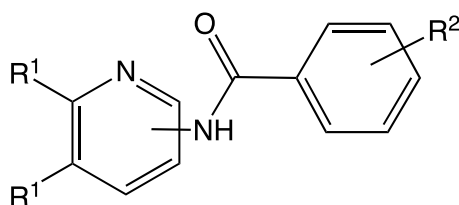
Graf č. 1: Závislost log P na charakteru substituce pyridinu; barva sloupců určuje typ substituentu R^2 benzenového jádra

Porovnáním vlivu lipofility na antimykobakteriální aktivitu těchto látek můžeme sledovat patrnou tendenci lipofilnějších látek k vykazování vyšší účinnosti (graf č. 2; aktivita vůči *M. aurum* není zobrazena, jelikož většina z připravených sloučenin byla neaktivní). Například sloučenina JZ-EV 14 s nejvyšší aktivitou z této řady derivátů (MIC pro *Mtb* H37Ra 15,625 $\mu\text{g/ml}$, pro *M. smegmatis* 31,25 $\mu\text{g/ml}$) má ve své struktuře kromě 2-amino-6-chlorpyridinu v poloze 4 methylem substituované benzenové jádro. Lipofilnější substituce benzenového jádra, konkrétně chlorem v poloze 2, přinesla vyšší aktivitu i u JZ-EV 6 (MIC = 62,5 $\mu\text{g/ml}$ pro *M. smegmatis* i *Mtb* H37Ra). Naopak deriváty s nesubstituovaným benzenovým jádrem vykazují nižší aktivity. Shrnutí těchto výsledků je uvedeno v tabulce č. 3.



Graf č. 2: Závislost antimykobakteriální aktivity vyjádřené jako $\log(1/\text{MIC} [\mu\text{M}])$ na $\log P$

Tabulka č. 3: Porovnání látek s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou vyjádřenou jako MIC ($\mu\text{g/ml}$) v závislosti na substituci benzenového jádra



	pyridin	R ²	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>Mtb</i> H37Ra
JZ-EV 5	2-NH ₂ -6-Cl	H	125	≥ 500	125
JZ-EV 6	2-NH ₂ -6-Cl	2-Cl	62,5	250	62,5
JZ-EV 14	2-NH ₂ -6-Cl	4-CH ₃	31,25	≥ 500	15,625

Porovnáním výše uvedeného a dříve získaných výsledků¹ lze konstatovat, že lipofilní substituce obou aromatických jader ve většině případů příznivě ovlivňuje antimykobakteriální aktivitu látek – v případě derivátů pyridinu je z připravených sloučenin nejvýhodnější 2-amino-6-chlor- substituce pyridinu a chlorem či methylem substituované benzenové jádro. Predikovaná lipofilita však není jednoznačným

determinantem antimykobakteriální aktivity, neboť i některé vysoce lipofilní sloučeniny byly neaktivní.

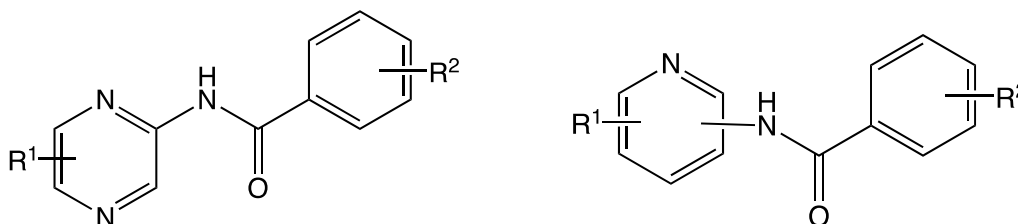
Sérií těchto látek jsme se začali zabývat díky prokázané *in vitro* antimykobakteriální aktivitě dříve připravených derivátů *N*-pyrazinylbenzamidů. U nich se nejvíce osvědčily substituované 5-chlorpyrazin-2-aminy, z nichž několik látek mělo MIC v rozmezí 3,13–25 µg/ml vůči *Mtb* H37Rv; deriváty odvozené od 6-chlorpyrazin-2-aminů a nechlorovaných pyrazinaminů vykazovaly nižší účinnosti.¹

Nás zajímalo, jaký vliv bude mít na účinnost sloučenin záměna atomu dusíku v molekule pyrazinu za uhlík, čímž dostaneme deriváty pyridinu, které se již v molekulách užívaných nejen v terapii TB hojně uplatnily. V rámci nově připravované série mají vyšší aktivitu deriváty 6-chlorpyridin-2-aminů v porovnání s jejich 5-chlorizomery, zejména co se týče *M. smegmatis* a *Mtb* H37Ra (MIC = 15,625–125 µg/ml), dokonce i nechlorované deriváty jsou srovnatelné/více účinné než 5-chlorpyridin-2-aminy.

MIC dříve publikovaných *N*-pyrazinylbenzamidů se u nejučinnějších derivátů pohybovala v rozmezí 3,13–25 µg/ml.¹ MIC námi připravených *N*-pyridylbenzamidů se u nejučinnějších derivátů pohybovala v rozmezí 15,625–62,5 µg/ml. Obecně, *N*-pyrazinylbenzamidy jsou tedy aktivnější než *N*-pyridylbenzamidy. Nicméně při přímém srovnání MIC dvojic stejně substituovaných derivátů pyrazinu proti *Mtb* H37Rv, respektive derivátů pyridinu proti *Mtb* H37Ra (tabulka č. 4) nalzáme i případy, kdy je *N*-pyridylbenzamid aktivnější než *N*-pyrazinylbenzamid (látky JZ-EV 6 a JZ-EV 14). Porovnání těchto dvou kmenů je možné, neboť poskytují srovnatelné výsledky; *Mtb* H37Ra je avirulentní kmen, který se využívá pro testy jako bezpečnější náhrada jeho virulentní formy *Mtb* H37Rv.⁵⁵

V případě společně testovaného kmenu *M. smegmatis* jsou převážně účinnějšími deriváty *N*-pyridylbenzamidů (tabulka č. 5).

Tabulka č. 4: Porovnání aktivit vyjádřených jako MIC ($\mu\text{g/ml}$) proti *Mtb H37Rv* u *N*-pyrazinylbenzamidů a proti *Mtb H37Ra* u stejně substituovaných *N*-pyridylbenzamidů



<i>N</i> -pyrazinylbenzamidů ¹				<i>N</i> -pyridylbenzamidů			
kód*	R ¹	R ²	MIC	kód	pyridin	R ²	MIC
1a	H	H	100	JZ-EV 3	2-NH ₂	H	250
2a	5-Cl	H	≥ 100	JZ-EV 2	2-NH ₂ -5-Cl	H	≥ 500
3a	6-Cl	H	≥ 100	JZ-EV 5	2-NH ₂ -6-Cl	H	125
1j	H	2-Cl	≥ 100	JZ-EV 10	2-NH ₂	2-Cl	≥ 500
2j	5-Cl	2-Cl	≥ 100	JZ-EV 1	2-NH ₂ -5-Cl	2-Cl	≥ 500
3j	6-Cl	2-Cl	≥ 100	JZ-EV 6	2-NH ₂ -6-Cl	2-Cl	62,5
1h	H	4-CH ₃	≥ 100	JZ-EV 11	2-NH ₂	4-CH ₃	125
2h	5-Cl	4-CH ₃	6,25	JZ-EV 13	2-NH ₂ -5-Cl	4-CH ₃	≥ 500
3h	6-Cl	4-CH ₃	≥ 100	JZ-EV 14	2-NH ₂ -6-Cl	4-CH ₃	15,625

* kód v původní publikaci

Tabulka č. 5: Porovnání aktivit vyjádřených jako MIC ($\mu\text{g/ml}$) proti *M. smegmatis* u *N*-pyrazinylbenzamidů a stejně substituovaných *N*-pyridylbenzamidů

<i>N</i> -pyrazinylbenzamidů ¹				<i>N</i> -pyridylbenzamidů			
kód*	R ¹	R ²	MIC	kód	pyridin	R ²	MIC
1a	H	H	≥ 500	JZ-EV 3	2-NH ₂	H	250
2a	5-Cl	H	≥ 500	JZ-EV 2	2-NH ₂ -5-Cl	H	62,5
3a	6-Cl	H	≥ 500	JZ-EV 5	2-NH ₂ -6-Cl	H	125
1j	H	2-Cl	250	JZ-EV 10	2-NH ₂	2-Cl	≥ 500
2j	5-Cl	2-Cl	≥ 500	JZ-EV 1	2-NH ₂ -5-Cl	2-Cl	≥ 500
3j	6-Cl	2-Cl	≥ 500	JZ-EV 6	2-NH ₂ -6-Cl	2-Cl	62,5
1h	H	4-CH ₃	≥ 500	JZ-EV 11	2-NH ₂	4-CH ₃	62,5
2h	5-Cl	4-CH ₃	≥ 500	JZ-EV 13	2-NH ₂ -5-Cl	4-CH ₃	≥ 500
3h	6-Cl	4-CH ₃	≥ 500	JZ-EV 14	2-NH ₂ -6-Cl	4-CH ₃	31,25

* kód v původní publikaci

Z naměřených hodnot aktivit látek, které byly testovány ve formě volných bází i hydrochloridů (JZ-EV 4, JZ-EV 12), nelze určit významné rozdíly v účinnosti. V případě JZ-EV 4 volná baza vykazovala vyšší aktivitu vůči mykobakteriím než příslušná sůl, u JZ-EV 12 byly aktivity soli/volné baze vyšší i nižší v závislosti na druhu mykobakterie. U obou látek se však jednalo o zanedbatelné rozdíly v podobě jednoho kroku na ředící škále.

Hodnoty biologického testování látky JZ-EV 7 jsou pouze orientační vzhledem k lehkému znečištění molekuly viditelném na ^1H NMR spektru, Tt a výsledcích elementární analýzy; s ohledem na malé množství získaného produktu však nebylo možné realizovat další čistící kroky.

K vyhodnocení *in vitro* cytotoxicity připravených sloučenin byla využita metoda CellTiter 96, která je založena na redukci tetrazolové sloučeniny MTS metabolicky aktivní buňkou na barevný formazan a následném měření jeho absorbance. V případě poklesu počtu živých buněk se snižuje i tvorba formazanu a tím i hodnota absorbance, tzn. hodnota absorbance je přímo úměrná počtu živých, tj. metabolizujících buněk.

Kvantitativní srovnání mezi jednotlivými látkami bylo možné díky výpočtu IC_{50} . V použitém rozmezí koncentrací není předpokládán žádný toxický účinek na buňky HepG2 u sloučenin JZ-EV 3, JZ-EV 4 a JZ-EV 12. U látek JZ-EV 1, JZ-EV 2, JZ-EV 9, JZ-EV 10, JZ-EV 13 docházelo i při nižších koncentracích k významnému srážení v kultivačním médiu, proto nebylo možné přesně určit jejich hodnoty IC_{50} . Z průběhu inhibičních křivek však lze u sloučenin JZ-EV 1, JZ-EV 10 a JZ-EV 13 předpokládat absenci cytotoxicity. Určité stádium toxicity dle hodnot IC_{50} v rozmezí 362,6–620,7 μM vykazují látky JZ-EV 5, JZ-EV 6, JZ-EV 7, JZ-EV 11, JZ-EV 14.

Pro posouzení selektivního účinku k mykobakteriím oproti lidským buňkám byly vypočítány indexy selektivity SI ($\text{SI} = \text{IC}_{50} [\mu\text{M}] / \text{MIC} [\mu\text{M}]$). Na základě výsledných hodnot $\text{SI} < 10$ (např. konkrétně u látky s nejvyšší naměřenou antimykobakteriální aktivitou JZ-EV 14 pro *M. smegmatis* $\text{SI} = 3$ a pro *Mtb* H37Ra $\text{SI} = 6$) vypovídajících o nedostatečné selektivitě nelze tyto sloučeniny označit za potenciálně bezpečné a tudíž nevhodné pro další vývoj.

5. Závěr

V teoretické části této diplomové práce jsem se zaměřila na charakterizaci tuberkulózy, byla zde stručně popsána podstata onemocnění, klinické projevy, diagnostika, epidemiologie, zmíněno bylo také dostupné očkování. Dále jsem uvedla možnosti současné terapie s charakteristikou jednotlivých léčiv, nejčastěji volené režimy léčby a diskutován byl i problém vzrůstající rezistence. Jelikož pro naše látky připravované v experimentální části tvoří klíčovou strukturu pyridin, byla další kapitola teorie věnována přínosu tohoto heterocyklu v molekulách již používaných léčiv.

V rámci praktické části bylo připraveno 13 derivátů *N*-pyridylbenzamidů, z nichž 4 jsou nové, v literatuře dosud nepopsané látky a dalších 9 již má vydané publikace, žádné však na vyhodnocení antimykobakteriálního účinku. Při syntéze docházelo k acylaci vybraných aminopyridinů nebo chlorpyridin-2-aminů substituovanými benzoylchloridy. Finální produkty byly charakterizovány ^1H a ^{13}C NMR spektry a IČ spektry, dále byla provedena elementární analýza, změřeny teploty tání a pomocí programu ChemDraw Professional 18.1 určeny molekulové hmotnosti a vypočítány hodnoty $\log P$, $\text{Clog } P$.

Všechny látky byly podrobeny biologickému testování na antimykobakteriální aktivitu, přičemž nejlepších výsledků dosahovaly deriváty s lipofilní substitucí pyridinového ($\text{R}^1 = 6\text{-Cl}$) i benzenového ($\text{R}^2 = 2\text{-Cl}, 4\text{-CH}_3$) jádra. Sloučeninou s nejvyšší účinností je JZ-EV 14 s MIC pro *Mtb* H37Ra 15,625 $\mu\text{g/ml}$ (63,3 μM) a pro *M. smegmatis* 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (126,7 μM). Dle vypočítaných indexů selektivity však nelze tuto látku označit za bezpečnou, hodnoty SI byly výrazně pod hranicí 10 (pro *M. smegmatis* SI = 3 a pro *Mtb* H37Ra SI = 6).

6. Seznam citované literatury

1. Zitko, J.; Mindlová, A.; Valášek, O.; Jand'ourek, O.; Paterová, P.; Janoušek, J.; Konečná, K.; Doležal, M. Design, Synthesis and Evaluation of *N*-pyrazinylbenzamides as Potential Antimycobacterial Agents. *Molecules* **2018**, *23* (9), Article No. 2390.
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019; WHO/CDS/TB/2019.15; Geneva, Switzerland, **2019**; dostupné z: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [8.12.2019].
3. Brennan, P. J.; Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64*, 29-63.
4. Rahlwes, K. C.; Sparks, I. L.; Morita, Y. S. Cell Walls and Membranes of Actinobacteria. *Subcell Biochem* **2019**, *92*, 417-469.
5. Murray P. R.; Rosenthal K. S.; Pfaller M. A. Medical Microbiology. [s.l.]: Elsevier Mosby, **2005**, 848.
6. Ptáková M., Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterií, *Medicína pro praxi* **2011**,*8*(11): 466-468.
7. Dheda, K.; Barry, C. E.; Maartens, G. Tuberculosis. *Lancet* **2016**, *387* (10024), 1211-1226.
8. Mladěnka, P. Přednáška, Tuberkulóza a její léčba, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2018**.
9. Golden, M. P.; Vikram, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* **2005**, *72* (9), 1761-1768.
10. Tuberkulóza, dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/tuberkuloza.html> [8.12.2019].
11. Současný přístup k diagnostice a léčbě tuberkulózy, převzato z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Respiracni-onemocneni/Soucasny-pristup-k-diagnostice-a-lecbe-tuberkulozy/8-1o-25o.magarticle.aspx> [19.12.2019].
12. Kolek. Tuberkulóza. In Kolek V, Kašák V, Vašáková M. Pneumologie, 2. rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, **2014**, ISBN 13: 978 80 7345 387 9, s. 225–243.
13. Tuberkulóza (TBC), S., dostupné z <http://www.szu.cz/tema/prevence/tuberkuloza-tbc> [11.2.2020].
14. Vašáková, M. [Current approach to diagnostics, treatment and prevention of tuberculosis]. *Vnitř Lek* **2018**, *63* (11), 815-820.
15. Park, S. I.; Oh, J.; Jang, K.; Yoon, J.; Moon, S. J.; Park, J. S.; Lee, J. H.; Song, J.; Jang, I. J.; Yu, K. S.; Chung, J. Y. Pharmacokinetics of Second-Line Antituberculosis Drugs after Multiple Administrations in Healthy Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (8), 4429-4435.
16. Antibiotické minimum, převzato z <https://www1.lfl.cuni.cz/~hroz/Atb2011/antibio10.htm#antituberkulotika>, [12.1.2020].
17. Vilchèze, C.; Jacobs, W. R. The Isoniazid Paradigm of Killing, Resistance, and Persistence in Mycobacterium tuberculosis. *J Mol Biol* **2019**, *431* (18), 3450-3461.
18. Zhu, C.; Liu, Y.; Hu, L.; Yang, M.; He, Z. G. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **2018**, *293* (43), 16741-16750.
19. Lucena, S. M. A.; Alberio, C. A. A.; Pinto, A. C. G.; Vieira, J. L. F. Serum pyrazinamide concentrations in patients with pulmonary tuberculosis. *J Bras Pneumol* **2019**, *45* (2), e20180254.
20. Wallenfels, J., Vašáková, M., & Solovič, I. (2018). Aktuální farmakoterapie tuberkulózy. *Klin Farmakol Farm* , *32* (4), 10-14.

21. Gopal, P.; Nartey, W.; Rangunathan, P.; Sarathy, J.; Kaya, F.; Yee, M.; Setzer, C.; Manimekalai, M. S. S.; Dartois, V.; Grüber, G.; Dick, T. Pyrazinoic Acid Inhibits Mycobacterial Coenzyme A Biosynthesis by Binding to Aspartate Decarboxylase PanD. *ACS Infect Dis* **2017**, *3* (11), 807-819.
22. Shi, W.; Chen, J.; Feng, J.; Cui, P.; Zhang, S.; Weng, X.; Zhang, W.; Zhang, Y. Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Emerg Microbes Infect* **2014**, *3* (8), e58.
23. Ruiz, P.; Rodríguez-Cano, F.; Zerolo, F. J.; Casal, M. [Streptomycin as second-line chemotherapy for tuberculosis]. *Rev Esp Quimioter* **2003**, *16* (2), 188-194.
24. Deshpande, D.; Alffenaar, J. C.; Köser, C. U.; Dheda, K.; Chapagain, M. L.; Simbar, N.; Schön, T.; Sturkenboom, M. G. G.; McIlleron, H.; Lee, P. S.; Koeuth, T.; Mpagama, S. G.; Banu, S.; Foongladda, S.; Ogarkov, O.; Pholwat, S.; Houpt, E. R.; Heysell, S. K.; Gumbo, T. d-Cycloserine Pharmacokinetics/Pharmacodynamics, Susceptibility, and Dosing Implications in Multidrug-resistant Tuberculosis: A Faustian Deal. *Clin Infect Dis* **2018**, *67* (suppl_3), S308-S316.
25. Deshpande, D.; Pasipanodya, J. G.; Mpagama, S. G.; Srivastava, S.; Bendet, P.; Koeuth, T.; Lee, P. S.; Heysell, S. K.; Gumbo, T. Ethionamide Pharmacokinetics/Pharmacodynamics-derived Dose, the Role of MICs in Clinical Outcome, and the Resistance Arrow of Time in Multidrug-resistant Tuberculosis. *Clin Infect Dis* **2018**, *67* (suppl_3), S317-S326.
26. Hicks, N. D.; Carey, A. F.; Yang, J.; Zhao, Y.; Fortune, S. M. Bacterial Genome-Wide Association Identifies Novel Factors That Contribute to Ethionamide and Prothionamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. *mBio* **2019**, *10* (2).
27. Scardigli, A.; Caminero, J. A.; Sotgiu, G.; Centis, R.; D'Ambrosio, L.; Migliori, G. B. Efficacy and tolerability of ethionamide versus prothionamide: a systematic review. *Eur Respir J* **2016**, *48* (3), 946-952.
28. Howe, M. D.; Kordus, S. L.; Cole, M. S.; Bauman, A. A.; Aldrich, C. C.; Baughn, A. D.; Minato, Y. Methionine Antagonizes *para*-Aminosalicylic Acid Activity via Affecting Folate Precursor Biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *Front Cell Infect Microbiol* **2018**, *8*, 399.
29. Pranger, A. D.; van der Werf, T. S.; Kosterink, J. G. W.; Alffenaar, J. W. C. The Role of Fluoroquinolones in the Treatment of Tuberculosis in 2019. *Drugs* **2019**, *79* (2), 161-171.
30. Disratthakit, A.; Prammananan, T.; Tribuddharat, C.; Thaipisuttikul, I.; Doi, N.; Leechawengwongs, M.; Chaiprasert, A. Role of gyrB Mutations in Pre-extensively and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis in Thai Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60* (9), 5189-5197.
31. WHO. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis, dostupné z <https://www.who.int/tb/publications/delamanid-in-mdr-tb-treatment/en/> [9.3.2020].
32. Lee, B. S.; Kalia, N. P.; Jin, X. E. F.; Hasenoehrl, E. J.; Berney, M.; Pethe, K. Inhibitors of energy metabolism interfere with antibiotic-induced death in mycobacteria. *J Biol Chem* **2019**, *294* (6), 1936-1943.
33. Liu, K.; Li, F.; Lu, J.; Liu, S.; Dorko, K.; Xie, W.; Ma, X. Bedaquiline metabolism: enzymes and novel metabolites. *Drug Metab Dispos* **2014**, *42* (5), 863-866.
34. Li, Y.; Sun, F.; Zhang, W. Bedaquiline and delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: Promising but challenging. *Drug Dev Res* **2019**, *80* (1), 98-105.
35. Ryan, N. J.; Lo, J. H. Delamanid: first global approval. *Drugs* **2014**, *74* (9), 1041-1045.

36. Vasava, M. S.; Nair, S. G.; Rathwa, S. K.; Patel, D. B.; Patel, H. D. Development of new drug-regimens against multidrug-resistant tuberculosis. *Indian J Tuberc* **2019**, *66* (1), 12-19.
37. Singh, B.; Cocker, D.; Ryan, H.; Sloan, D. J. Linezolid for drug-resistant pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2019**, *3*, CD012836.
38. Shoen, C.; DeStefano, M.; Hafkin, B.; Cynamon, M. *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Contezolid (MRX-I) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2018**, *62* (8), e00493-18.
39. Heinrich, N.; Dawson, R.; du Bois, J.; Narunsky, K.; Horwith, G.; Phipps, A. J.; Nacy, C. A.; Aarnoutse, R. E.; Boeree, M. J.; Gillespie, S. H.; Venter, A.; Henne, S.; Rachow, A.; Phillips, P. P.; Hoelscher, M.; Diacon, A. H.; (PanACEA), P. A. C. f. t. E. o. A. A.; PanACEA, P. A. C. f. t. E. o. A. A. Early phase evaluation of SQ109 alone and in combination with rifampicin in pulmonary TB patients. *J Antimicrob Chemother* **2015**, *70* (5), 1558-1566.
40. Sacksteder, K. A.; Protopopova, M.; Barry, C. E.; Andries, K.; Nacy, C. A. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol* **2012**, *7* (7), 823-837.
41. Guidelines, pneumologie. Tuberkulóza dospělých (Standard léčebného plánu), dostupné z <http://www.pneumologie.cz/guidelines/> [21.2.2020].
42. Lange, C.; Dheda, K.; Chesov, D.; Mandalakas, A. M.; Udawadia, Z.; Horsburgh, C. R. Management of drug-resistant tuberculosis. *Lancet* **2019**, *394* (10202), 953-966.
43. Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L. Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2015**, *5* (9), a017863.
44. Albanna, A. S.; Smith, B. M.; Cowan, D.; Menzies, D. Fixed-dose combination antituberculosis therapy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* **2013**, *42* (3), 721-732.
45. Micheletti, G.; Calonghi, N.; Farruggia, G.; Strocchi, E.; Palmacci, V.; Telese, D.; Bordoni, S.; Frisco, G.; Boga, C. Synthesis of Novel Structural Hybrids between Aza-Heterocycles and Azelaic Acid Moiety with a Specific Activity on Osteosarcoma Cells. *Molecules* **2020**, *25* (2), Article No. 404.
46. HARTL, J. *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 978-80-246-1169-3.
47. Singh, A.; Nair, S.; Jain, R. Pyridoxine responsive seizures secondary to isoniazid prophylaxis in an infant. *Neurol India* **2017**, *65* (Supplement), S94-S95.
48. Kim, H.; Shibayama, K.; Rimbara, E.; Mori, S. Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. *PLoS One* **2014**, *9* (6), e100062.
49. Xu, F.; Wang, Y.; Xun, X.; Huang, Y.; Jin, Z.; Song, B.; Wu, J. Diverse Oxidative C(sp²)-N Bond Cleavages of Aromatic Fused Imidazoles for Synthesis of α -Ketoamides and *N*-(pyridin-2-yl)arylamides [Journal of Organic Chemistry, **2019**, vol. 84, # 13, p. 8411 - 8422].
50. Fan, W.; Yang, Y.; Lei, J.; Jiang, Q.; Zhou, W. Copper-Catalyzed *N*-Benzylation of Amines via Aerobic C-C Bond Cleavage [Journal of Organic Chemistry, **2015**, vol. 80, # 17, p. 8782 - 8789].
51. Park; Jung; Kim; Kim; Song; Kim; Photoreaction of 2-Halo-*N*-pyridinylbenzamide: Intramolecular Cyclization Mechanism of Phenyl Radical Assisted with n -Complexation of Chlorine Radical [Journal of Organic Chemistry, **2001**, vol. 66, # 7, p. 2197 - 2206].

52. Zhang, Z.; Li, X.; Li, Y.; Guo, Y.; Zhao, X.; Yan, Y.; Sun, K.; Zhang, G.; Iodine-mediated aryl transfer reaction from arylhydrazine hydrochlorides to nitriles, [Tetrahedron, **2019**, vol. 75, # 26, p. 3628 - 3635].
53. Patel, O. P. S.; Anand, D.; Maurya, R. K.; Yadav, P. P.; Copper-catalyzed highly efficient oxidative amidation of aldehydes with 2-aminopyridines in an aqueous micellar system [Green Chemistry, **2015**, vol. 17, # 7, p. 3728 - 3732].
54. Elemans, J. A. A. W.; Bijsterveld, E. J. A.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Manganese Porphyrin Hosts as Epoxidation Catalysts – Activity and Stability Control by Axial Ligand Effects [European Journal of Organic Chemistry, **2007**, # 5, p. 751 - 757].
55. Ambrozkiewicz, W.; Kučerová-Chlupáčová, M.; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Paterová, P.; Bárta, P.; Vinšová, J.; Doležal, M.; Zitko, J. 5-Alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides: Design, Preparation, and Antimycobacterial Evaluation. *Molecules* **2020**, 25 (7), Article No. 1561.