

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Deriváty pyrazinamidu jako potenciální
antituberkulotika**

Dizertační práce

2009

Mgr. Lukáš Palek

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským díle, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování dizertační práce čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum

podpis

Tímto vřele děkuji doc. Martinu Doležalovi, Ph.D., školiteli za jeho trpělivost a užitečné rady, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

1 Obsah

1	OBSAH	1
2	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
3	FORMULACE PROBLEMATIKY	5
3.1	TUBERKULÓZA	5
3.1.1	<i>Patologie onemocnění</i>	5
3.1.2	<i>Epidemiologická fakta o tuberkulóze</i>	7
3.1.3	<i>Legislativní ustanovení o tuberkulóze, jejím sledování, kontrole, léčbě a podpoře výzkumu a vývoje nových léčiv</i>	8
3.1.4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
3.2	SOUČASNÁ FARMAKOTERAPIE TUBERKULÓZY	12
3.2.1	<i>Rozdělení používaných léčiv</i>	13
3.2.2	<i>Inhibitory syntézy mykolové kyseliny</i>	17
3.2.3	<i>Inhibitory syntézy arabinogalakanu a peptidoglykanu</i>	18
3.2.4	<i>Inhibitory proteosyntézy</i>	20
3.2.5	<i>Léčiva ovlivňující DNA procesy</i>	24
3.2.6	<i>Inhibitory dihydrofolát reduktasy</i>	25
3.2.7	<i>Farmakoterapie tuberkulózy citlivé na léčiva první volby</i>	26
3.2.8	<i>Farmakoterapie tuberkulózy rezistentní na alespoň jedno léčivo první volby (DR-TB a MDR-TB)</i>	27
3.2.9	<i>Farmakoterapie tuberkulózy rezistentní na většinu konvenčních antituberkulotik (XDR-TB)</i>	28
4	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	30
4.1	VÝVOJ NOVÝCH ANTITUBERKULOTIK	30
4.1.1	<i>Léčiva ve fázích 1-3 klinických studií</i>	30
4.1.2	<i>Nové cíle možného zásahu mykobaktérií a nadějně struktury v preklinických fázích vývoje</i>	35
4.1.3	<i>Deriváty pyrazinamidu s publikovanou antimykobakteriální aktivitou</i>	42
5	VÝVOJ NOVÝCH LÉČIV PROTI TUBERKULÓZE NA KFCHKL FAF UK	46
5.1	JIŽ PUBLIKOVANÁ FAKTA.....	46
5.2	VYMEZENÍ TEMATIKY A JEJÍ ZAŘAZENÍ DO VĚDECKO-VÝZKUMNÝCH SOUVISLOSTÍ KFCHKL FAF UK	46
5.3	ZPŮSOB ŘEŠENÍ TÉMATU	46
5.3.1	<i>Vymezení tématu z pohledu chemického</i>	47

5.3.2	<i>Flash Chromatografie</i>	47
5.3.3	<i>Hodnocení antimykobakteriální aktivity</i>	48
5.3.4	<i>Hodnocení antifungální aktivity</i>	49
5.4	PYRAZINAMID.....	50
5.4.1	<i>Farmaceuticko-chemické vlastnosti pyrazinamidu</i>	51
5.4.2	<i>Farmakologické vlastnosti pyrazinamidu</i>	51
5.4.3	<i>Chemické vlastnosti pyrazinového jádra a možné reakce na něm</i>	54
5.4.4	<i>Příprava pyrazin-2-karboxylových kyselin a jejich funkčních derivátů ...</i>	66
6	DOSAŽENÉ VÝSLEDKY - KOMENTÁŘ PUBLIKOVANÝCH VÝSLEDKŮ	68
6.1	FLASH CHROMATOGRRAFIE	68
6.2	PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ 3-CHLOROPYRAZIN, 5-CHLOROPYRAZIN NEBO 6-CHLOROPYRAZINKARBOXYLOVÝCH KYSELIN.....	70
6.3	N-SUBSTITUOVANÁ ANALOGA PYRAZINAMIDU	70
6.4	DERIVÁTY ODVOZENÉ OD PYRAZIN-2,5-DIKARBONITRILU.....	72
6.5	DISKUSE DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ Z POHLEDU VZTAHU STRUKTURY A BIOLOGICKÉ AKTIVITY	73
7	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ... 76	
8	PUBLIKOVANÉ PRÁCE	82
9	SOUHRN V ČESKÉM JAZYCE	111
10	SOUHRN V ANGLICKÉM JAZYCE	113
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	115

2 Seznam použitých zkratek

TBC	Tuberkulóza
DR-TBC	Drug-resistant tuberculosis, tuberkulóza rezistentní alespoň na jedno léčivo první volby
MDR-TBC	Multi-drug resistant tuberculosis, tuberkulóza rezistentní na více léčiv první volby
XDR-TBC	Extensively-drug resistant tuberculosis, tuberkulóza rezistentní na více léčiv první a druhé volby a na fluorchinolony
HIV	Human immunodeficiency virus, virus způsobující ztrátu imunity u lidí
MIC	Minimum inhibitory concentration, minimální inhibiční koncentrace
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration, koncentrace inhibující cílovou strukturu z 50 %
EC ₉₅	95 % effective concentration, koncentrace látky účinkující na 95 % cílových struktur
EC ₉₉	99 % effective concentration, koncentrace látky účinkující na 99 % cílových struktur
WHO	World health organisation, Světová zdravotnická organizace
IUATLD	International union against tuberculosis and lung disease, mezinárodní unie proti tuberkulóze a plicním onemocněním
BCG	Bacillus Calmette Guérin
TAACF	Tuberculosis antimicrobial acquisition and coordinating facility, služba pro koordinaci a antimikrobiální testování antituberkulotik
NIAID	National institute of allergy and infectious diseases, Národní institut alergií a infekčních onemocnění
NIH	National institute of health, Národní institut zdraví
ATP	adenosintrifosfát
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
KFCHKL	Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

KAOCH Katedra anorganické a organické chemie

FT-IR Fourier-transformed infrared spectroscopy, spektroskopie
v infračervené oblasti, transformovaná dle Fouriera

NMR Nuclear magnetic resonance, nukleární magnetická rezonance

MS Mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

HPLC High pressure liquid chromatography, vysokotlaká kapalinová
chromatografie

$\log P$ logaritmus rozdělovacího koeficientu

NO oxid dusnatý

3 Formulace problematiky

3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění, které je lidstvu známo již dlouhá tisíciletí. Jednoznačně předchází první psané slovo a velmi pravděpodobně doprovází člověka od samotného počátku vyčlenění druhu *Homo sapiens sapiens*. Nicméně nejstarší fosilní nálezy lidí s prokazatelnou infekcí tuberkulózou jsou staré zhruba 9 000 let¹.

Toto onemocnění je způsobeno organismy zvanými mykobaktéria, především druhem *Mycobacterium tuberculosis*, jehož objevitelem je Robert Koch (odtud Kochův bacil). Koch svým objevem způsobil zvrat v léčbě TBC a zahájil éru kauzální léčby této infekce. I přes to, že u počátku rozvoje farmaceutické chemie, přesněji systematického hledání chemických léčiv, stojí látky, které se uplatňovaly při léčbě infekčních onemocnění² (např. Prontosil), dodnes je terapie této nemoci komplikovaná, zdlouhavá a ne vždy úspěšná.

3.1.1 Patologie onemocnění

Nejčastější příčinou onemocnění tuberkulózou je infekce bakterií zvanou *Mycobacterium tuberculosis*. Mykobaktérium je tenký, lehce zahnutý obligatorně aerobní bacil, který má buněčnou stěnu tvořenou vysokým podílem lipidů a díky tomu je rezistentní vůči klasickému Grammovu barvení. Tyto bacily jsou barvitelné fuchsinem, od kterého se velmi těžko odbarvují např. i kyselým alkoholem, odtud pochází název „acid-fast“ bacily, které je možno celkem lehce identifikovat ze sputa nemocného.

Mnohem méně často se setkáváme s tuberkulózou způsobenou jiným druhem z rodu *Mycobacterium*, jako je třeba *M. bovis*, *M. avium*, *M. kansasii* nebo *M. smegmatis*. K přenosu onemocnění dochází nejčastěji vzduchem, kterým jsou přenášeny částice zvané kapénky. Ty se obvykle uvolňují do okolí kašlem, mluvením nebo např. zpěvem nemocného postiženého plicní nebo laryngeální formou TBC. Životaschopné zárodky vydrží poletovat vzduchem celkem dlouhou dobu, a tak může dojít k jejich rozšíření např. po celém objektu.

K nákaze dochází nejčastěji tak, že jedinec vdechne kapénku nesoucí mykobaktéria. Ta se zachytí v plicích, nejčastěji ve středním nebo spodním

plicním laloku, kde dojde k jejich fagocytóze makrofágem. V tomto momentě se rozhoduje o budoucí nemoci nebo zdraví. Je známo, že rezistence vůči ataku mykobaktéria je dána geneticky a o výsledku vždy rozhoduje poměr mezi schopností makrofága bacil zabít a virulencí bacilu. V případě že je infekce dostatečně virulentní se začnou bacily v makrofágu množit a když je jich makrofág plný, dojde k jeho smrti rupturou, ze které se vyplaví generace potomků prvotního infekta. V této periodě mohutného nárůstu počtu bacilů dojde k jejich roznesení krevním a lymfatickým řečištěm téměř do všech tkání. Tento logaritmický nárůst počtu bacilů končí obvykle po 2-10ti týdnech, kdy dojde ke vzniku buněčné imunity a přecitlivělosti organismu na bacily. Tím dojde k zatažení nárůstu jejich počtu a postupnému vyléčení lézí.

Bohužel, část bacilů velmi často přežije, v organismu se zamaskuje a zůstává životaschopná po mnoho let. Této formě se říká tzv. latentní TBC. U jedinců s nedostatečně vyvinutou imunitou dojde do 12 měsíců po prvotní infekci k reinfekci, která se zve post-primární infekce. Jedná se často o lidi HIV pozitivní, lidi s nedobře vyvinutou funkcí T-lymfocytů nebo makrofágů či o lidi závislé na alkoholu nebo jiných drogách.

Post-primární infekce se může projevit kdekoliv v těle, nejčastěji tomu však je v horních plicních lalocích. Vysvětlením, proč právě zde, je vyšší tenze kyslíku a relativně horší lymfatické zásobení této části plic. Post-primární forma infekce je téměř vždy spojena s jistou destrukcí tkáně. Na rozdíl od imunitní reakce makrofágů na primární infekci je následná hypersenzitivní reakce při vzniku post-primární infekce spojena s tvorbou nekrotické tkáně. Dochází ke vzniku nekrotických kavít, které organismus léčí resorpcí ztekutělého obsahu doprovázeném depozicí kolagenu. Kalcifikace těchto lézí se objevuje celkem často, ale v žádném případě neznamena sterilitu tkáně. Těmto útvarům se říká tuberkuly (uzlíky), od jejichž výskytu je odvozeno pojmenování celého onemocnění.

Výše popsaná plicní forma TBC může přejít v jiné formy jako jsou tracheobronchiální, pleurální, maningeální, gastrourinární a další. Nicméně ve srovnání s plicní TBC činí součet výskytu všech ostatních forem cca 20 %.

Klinický obraz pacientů s TBC je často velmi nespecifický a asi v 5 % případů probíhá onemocnění asymptoticky. Mezi nejčastější příznaky patří

mírně zvýšená teplota, anorexie, únava a úbytek váhy. Tyto symptomy mohou přetrvávat po měsíce. Ve fázi vzniku přecitlivělosti se může objevovat celkové zarudnutí. Nejčastějším příznakem je pak kašel, který může být zprvu neproduktivní, s přibývajícím časem pak produktivní s možným výskytem krvavě zbarveného sputa.

Nejkomplikovanější je diagnóza u dětí a starších pacientů (>65 let), u kterých se klasické výše popsané klinické příznaky vyskytují v menším procentu. Obecně platí, že klinický obraz nemocného je v úzké souvislosti s jeho kondicí a stavem imunitního systému a lze říci, že je velice proměnlivý³.

3.1.2 Epidemiologická fakta o tuberkulóze

Z celosvětové populace je asi třetina lidí hostitelem mykobaktéria. U většiny nositelů se onemocnění za celý život neprojeví, během života onemocní pouze asi jeden z deseti hostitelů, ale pokud onemocní, pak jsou čtyři z deseti nakažených léčeni nedostatečně⁴. TBC se většinou projevuje u lidí v produktivním věku, kteří žijí především v rozvojových zemích nebo zemích třetího světa. V roce 2006 zemřelo 1 700 000 lidí na TBC, z toho bylo 231 000 koinfikováno HIV. Dále bylo v roce 2006 diagnostikováno 9 600 000 nových případů TBC, z čehož bylo 709 000 případů koinfekce HIV. I když byl největší nárůst nových případů zaznamenán v letech 2003 a 2004, počet mrtvých stále díky nárůstu počtu obyvatel naší planety roste. V posledních letech byl zaznamenán pokles nebo stagnace nových případů ve všech regionech⁵.

Koincidence TBC a HIV je velkým epidemiologickým problémem, TBC je největší zabiják lidí s HIV. Především subsaharská Afrika, kde žije 0,7 % světové populace, představuje se svými 28 % největší rezervoár lidí se zmíněnou koincencí TBC a HIV⁶.

Velkým problémem se v posledních letech stává též tzv. MDR-TBC⁷, což je forma infekce, která neodpovídá na léčbu léčivy první volby a po jejich použití nedojde k vyléčení. Z celkového počtu diagnostikovaných onemocnění představuje takováto forma TBC 5 % ze všech případů. Hrozí reálné nebezpečí, že pokud se nedostane tato forma TBC pod kontrolu, bude velmi brzy široce rozšířena. Každý rok se objeví zhruba 490 000 nových případů MDR-TBC, které způsobí asi 130 000 případů úmrtí. Nejvyšší incidence MDR-TBC je každoročně

oznamována z některých regionů bývalého Sovětského svazu a z Číny, kde představuje 22 % všech nově diagnostikovaných případů TBC⁸.

V první dekádě tohoto století byl zjištěn výskyt tzv. XDR-TBC, což je forma onemocnění, která neodpovídá ani na léčbu látkami druhé volby a je v současné době téměř neléčitelná⁹. V jihoafrickém regionu bylo zjištěno, že 52 z 53 lidí infikovaných touto formou TBC a zároveň HIV zemře do tří týdnů. Nejvíce případů XDR-TBC se vyskytuje též v bývalém Sovětském svazu a v Číně, kde je každý desátý případ diagnostikované MDR-TBC zařazen jako XDR-TBC. Celosvětově se objevuje 40 000 nových případů XDR-TBC ročně a nález této formy onemocnění oznámilo do března 2008 více než 45 zemí z celého světa, včetně České republiky¹⁰.

3.1.3 Legislativní ustanovení o tuberkulóze, jejím sledování, kontrole, léčbě a podpoře výzkumu a vývoje nových léčiv

TBC, jakožto jedno z celosvětově nejvíce problematických onemocnění, je jedním z hlavních témat politiky WHO. Na základě dokumentů této organizace jsou země, které jsou jejími členy nuceny implementovat standardy léčby a musí přesně sledovat výskyt jednotlivých forem této nemoci. V 90. letech minulého století byla v souvislosti s alarmujícím nárůstem počtu diagnostikovaných onemocnění vypracována strategie DOTS (Directly Observed Treatment Short-course)¹¹. Do roku 2006 přijalo a implementovalo tuto strategii 184 zemí, což představuje 99 % všech nových oznámených případů a pokrývá 93 % světové populace⁴. Ne ve všech zemích jsou však ideální podmínky pro provádění DOTS strategie. V celkem 90ti zemích, ve kterých se objeví 93 % ze všech nových případů chybí cca 1 000 000 000 USD pro rozvoj a kvalitní naplňování tohoto přístupu k terapii. DOTS strategie zahrnuje a) politický souhlas s udržováním nebo zvyšováním financování programů pro boj s TBC, b) kvalitní detekci nových případů validovanými mikrobiologickými postupy, c) standardizovanou léčbu s dozorem a podporou compliance pacienta, d) efektivní zásobování léky a e) kvalitní monitorovací a vyhodnocovací metodiku, která má sloužit jako podklad pro adaptaci léčebných metodik na základě vyhodnocených dat.

V roce 2000 vytvořila WHO společně se Světovou bankou na základě neuspokojivých epidemiologických dat program s názvem STOP TB partnership¹², který má za úkol sjednotit postup členských zemí, alokovat dostatek finančních prostředků pro zvládnutí hrozící epidemie tuberkulózy a pomoci v nejhůře postižených oblastech.

Na poli výzkumu tuberkulózy a vývoje nových léčebných postupů se relativně dlouhou dobu nic nedělo – v podstatě celou druhou polovinu 20. století¹³. V roce 2001 byly oficiálně formulovány dva hlavní důvody tohoto stavu. Za prvé byla dlouhou dobu vědecká komunita přesvědčena, že není potřeba vývoje nových léčiv a terapeutických postupů, za druhé se k této problematice stavěly farmaceutické firmy tak, že vývoj léčiv, které by měly nový mechanismus účinku je velmi drahý a návratnost takových investic je nejistá¹³. Proto byla ustanovena nezisková organizace Global Alliance for TB Drug development již vdechla život The Rockefeller Foundation. Tato organizace je postavena na propojení veřejných a soukromých zdrojů a vytkla si za cíl zrychlení objevů a vývoje nových léčiv proti TBC s podmínkou cost-effectiveness¹⁴. Základní formou podpory je poskytování grantů jednotlivým nadějným projektům či spolufinancování velmi nákladných klinických studií nových struktur s cílem dostat tyto, za splnění všech požadavků na kvalitu, bezpečnost a účinnost, v co nejkratší době do rozšířeného klinického užití.

Navíc v souvislosti s nárůstem výskytu MDR-TBC a XDR-TBC byla definována akutní potřeba vývoje nových léčiv s novými mechanismy účinku. Proto byly vytvořeny grantové programy organizované vládami bohatých zemí, WHO i filantropickými spolky, kterými jsou rozdělovány finanční prostředky pro podporu výzkumu a vývoje orientovaného na léčbu tuberkulózy. Do těchto programů se zapojily i velké farmaceutické firmy (Pfizer, Sanofi-Aventis, Bristol-Meyers Squibb, Johnson & Johnson a další).

Tato strategie se již po krátké době osvědčila a přinesla jednak velmi detailní popis mycobaktéria a jednak nová léčiva s novým mechanismem účinku, která se již dostala do finálních fází klinického vývoje¹⁵.

3.1.4 Mycobacterium tuberculosis

Hlavním patogenem, který má na svědomí nákazu TBC je *Mycobacterium tuberculosis*. S. T. Cole a kol. publikovali v roce 1998 přelomovou práci¹⁶, která

kromě rozluštění kompletní genetické sekvence kmenu *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, infektu s lidskou virulencí poprvé izolovaného v roce 1905, popsala na základě rozluštění funkce mnoha genů fyziologické procesy tohoto organismu a též mechanismy probíhající při ovlivnění mykobaktéria léčiv. Tento poznatek je příslibem znalostmi podepřeného racionálního vývoje nových léčebných postupů vedoucích ke kontrole TBC, bakteriální infekce, která dodnes způsobuje největší počet úmrtí ze všech bakteriálních infekcí. Dobrá znalost fyziologie bacilu už dnes přispívá k poznání mechanismu účinku již známých antimykobakteriálních látek a též k popisu vzniku rezistence na ně, což může do budoucna znamenat podstatné zrychlení a zlepšení účinnosti léčby i komplikovaných případů.

Nejcharakterističtějšími znaky mykobaktérií je pomalý růst (v *in vitro* prostředí i v *in vivo* zvířecích modelech je generační doba ~24 hodin), schopnost dormance, komplexní „buněčná schránka“, intracelulární patogeneze a genetická homogenita¹⁷. Všechny tyto znaky přispívají k chronickému charakteru TBC infekce, kdy je ve stavu dormance, která je pravděpodobně geneticky kódována, zřejmě souvisí se vznikem buněčné imunity hostitele a pravděpodobně způsobuje ukončení metabolické aktivity mykobakteria, schopen tento bacil přežít v hostiteli po desítky let a během stárnutí nebo snížení jeho imunity se reaktivovat.

Zmíněná buněčná schránka obsahuje vedle peptidoglykanu velké množství neobvyklých mastných kyselin, glykolipidů a polysacharidů. Díky v přírodě neobvyklým syntetickým cestám jsou syntetizovány látky jako mykolové kyseliny, mykolocerosová kyselina, fenolthiocerol, lipoarabinomannan nebo arabinogalaktan.

Díky přečtení kompletní genové sekvence mykobaktéria je jasné, že se jedná o zcela unikátní organismus, který se svými aspekty v mnohém liší od ostatních bakterií a leckdy lze najít v jeho genové výbavě spojitosti s eukaryontními organizmy i houbami. Enzymatická výbava mykobaktéria umožňuje tomuto organismu syntézu všech esenciálních aminokyselin, vitamínů a dalších potřebných enzymových kofaktorů. Jeho genom kóduje velké množství oxidoreduktas, oxidas i dehydrogenas včetně oxygenas obsahujících CYP450, nebo hemoglobinu podobné struktury.

Zcela signifikantní je schopnost bacilu přizpůsobit se širokému spektru okolních podmínek, ve kterých musí například soutěžit o přísun kyslíku v plicích, ale také čelit mikroaerobním až anaerobním podmínkám v centru granulózní tkáně¹⁸.

Geneticky je též kódovaná přirozená rezistence mykobaktéria vůči mnoha antibakteriálním léčivům. Za tuto rezistenci zodpovídá v první řadě silně lipofilní buněčná stěna organismu, ovšem v genomu lze nalézt např. β -laktamasy, aminoglykosid acetyl transferasy, i řadu proteinů zodpovědných za účinný eflux léčiv¹⁹.

Výše zmíněný metabolismus lipidů je zcela unikátní. Jen velmi málo jiných organismů produkuje tak pestré spektrum lipidů jako je právě mykobaktérium¹⁷. Jde o spektrum sahající od relativně jednoduchých látek jako je palmitát nebo tuberkulostearát, přes izoprenoidy až po velmi lipofilní a složité struktury jako např. mykolová kyselina nebo fenolftioceroly, kterými jsou esterifikovány mukocerosové kyseliny, jež tvoří skelet pro připojení mykosidů. Analýza genomu bacilů kultivovaných *in vitro* značí, že mykobaktéria jsou zaměřená spíše lipolyticky nežli lipogenně. Toto zjištění může souviset s faktem, že prostředí savčího organismu poskytuje velké množství i variabilitu lipidů.

Z pohledu syntézy lipidů lze říci, že jsou v mykobaktériích přítomny minimálně dva typy enzymů. Jedná se o FAS-1, který zabezpečuje syntézu kratších esterů mastných kyselin s koenzymem A z acetylkoenzymu A jako substrátu¹⁷, a FAS-2, který se stará o elongaci kyselin vázaných na ACP v rozsahu od 24 do 56 uhlíků²⁰. Na tyto hlavní dva enzymy navazuje kaskáda reduktas, které se starají o zabezpečení syntézy unikátních mastných kyselin specifických právě pro mykobaktéria.

Z pohledu imunologie a patogenity těchto organismů bylo zjištěno, že vakcinace lidské populace musí zůstat předním cílem obecného snažení, jelikož byly detekovány povrchové imunogenní peptidy, jejichž výroba a aplikace může zajistit vyšší účinnost nežli je BCG vakcinace. Co se týče mechanismu virulence mykobaktérií, přestože je znám celý genom tohoto organismu, bylo detekováno velmi málo struktur způsobujících jeho virulenci. Detailně byly popsány pouze 3 mechanismy tohoto procesu, jedná se o přítomnost katalasy-peroxidasy, jež chrání mykobaktérium od reaktivních forem kyslíku, dále pak faktor způsobující

kolonizaci mikrofágů a gen kódující faktor sigma²¹, jehož mutace způsobuje ztrátu virulence. Genetický základ virulence je však velmi komplexní a dodnes je v něm řada otázek a témat k dalšímu studiu²². Dalším velmi podstatným faktorem virulence je syntéza buněčné stěny, nicméně v tomto případě se jedná o nesmírně komplexní proces, ve kterém jsou sice identifikované geny zodpovědné za její syntézu, nicméně regulační geny, jejichž vyřazení by způsobilo poruchu její syntézy, jsou popsány zatím nedostatečně²³. Na závěr je nutno podotknout, že popis genomu je nezbytný pro racionální vývoj nových způsobů léčby založených na kvalitní bioinformatice²⁴.

3.2 Současná farmakoterapie tuberkulózy

TBC je v současnosti jedním z onemocnění, které jsou bedlivě sledovány WHO jako globální hrozby, tím pádem i jednotlivými národními orgány, které mají na starost dohled nad zdravím obyvatelstva. Bylo publikováno mnoho guidelines, které obsahují standardní terapeutické algoritmy pro správnou léčbu tohoto onemocnění. V současné době je nejcitovanější guideline publikovaný American Thoracic Society s názvem Treatment of Tuberculosis²⁵.

Tento guideline je použitelný v zemích, kde je dobře rozvinutá zdravotní péče. V zemích kde tomu tak není, je potřeba následovat doporučení vydaná WHO²⁶ a IUATLD²⁷, která řeší principy terapie TBC v nepříznivých podmínkách.

Obecně lze léčbu TBC rozdělit na léčbu TBC citlivou na léčiva první volby, léčbu DR-TBC nebo MDR-TBC (citlivou na léčiva druhé volby a rezistentní na alespoň jedno - DR-TBC - nebo více - MDR-TBC - léčiv první volby) a léčbu XDR-TBC (rezistentní na izoniazid, rifampicin, alespoň jeden fluorochinolon a jedno injekční léčivo druhé volby)¹⁰. Dále lze každou z těchto terapií dělit na léčbu HIV negativních a HIV pozitivních pacientů, která se u TBC citlivé na prvoliniová léčiva výrazně neliší. Jinak je tomu u rezistentních forem infekce, kdy může být tato kombinace infekcí doslova smrtícím koktejlem²⁸. Speciální pozornost si pak žádá léčba netypické TBC, tzv. extrapulmonární TBC, léčba pacientů s renální nebo hepatální insuficiencí a léčbu dětí nebo gravidních žen⁹.

3.2.1 Rozdělení používaných léčiv

Předem je nutno říci, že v souvislosti s prudkým nárůstem incidence DR-TBC je empiricky používáno velké množství léčiv, u kterých je naděje, že budou mít alespoň statickou, lépe pak cidní aktivitu. Výčet všech látek publikovaných pro terapii komplikovaných případů rezistentní TBC přesahuje rámec této práce. Vybrány byly látky, které jsou uváděny v terapeutických guidelinech nadnárodních regulačních úřadů, především WHO a IUATLD.

Celé spektrum antimykobakteriálních látek lze podle těchto guidelines rozdělit takto, v dalším textu pak bude děleno dle mechanismu účinku doprovázeno dělením dle chemické struktury.

Skupina léčiv	Léčivo	Léková forma	Obchodní název
První volba perorální	izoniazid	tablety	Cotinazin [®] (Pfizer); Hycozid [®] (Takeda) ²⁹
	rifampicin	tablety	Abrifam [®] (Abbott); Rifaldin [®] (Aventis) ³⁰
	etambutol	tablety	Dadibutol [®] , Etibi [®] , Tibutol ^{®31}
	pyrazinamid	tablety	Piraldina [®] (Bracco); Zinamide [®] (Merck & Co.) ³²
	rifabutin	tablety	Ansamycin [®] , Alfacid [®] , Ansatipin [®] , Ansatipline ^{®33}
Druhá volba injekční	kanamycin	i.v. nebo i.m. injekce	Aminodeoxykanamycin [®] , Bekanamycin ^{®34}
	amikacin	i.v. nebo i.m. injekce	Sulfate- Amyglide-V [®] , Biklin [®] , Pierami ^{®35}

	cin kapreomy	i.v. nebo i.m. injekce	Capastat [®] , Ogostal ^{®36}
	cin streptomy	i.v. nebo i.m. injekce	Sesquisulfate- AgriStrep [®] (Merck & Co.); ³⁷

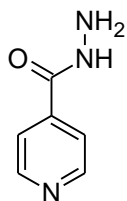
Druhá volba perorální	ethionamid	tablety	Trecator [®] (Wyeth); Iridocin [®] (Bayer) ³⁸
	prothionamid	tablety	Prothacid ³⁹
	cykloserin	tablety	Oxamycin [®] , Seromycin ^{®40}
	terizidon	Tablety	Terizidon [®]
	p-aminosalicylová kyselina	Tablety	PASER [®] (Jacobus); Rezipas [®] (Bristol-Myers Squibb) ⁴¹
Fluorochin olony	levofloxacin	tablety	Tavanic [®] (Aventis); Quixin [®] (Santen) ⁴²
	ofloxacin	tablety	Ofloxin [®] , Tariflox [®]
	moxifloxacin	Tablety nebo i.v. injekce	Actimax [®] (Sankyo); Actira [®] (Bayer), ⁴³
Látky s nejasnou účinností	klofazimin	Tablety	Lampren ^{®44}
	linezolid	Tablety nebo i.v. injekce	Zyvox [®] , Zyvoxid [®] (Pfizer) ⁴⁵
	amoxicilin / klavulanát	tablety	Augmentin [®] , Amoksiklav [®]
	klaritromycin	Tablety nebo retardované	Macladin [®] , Zeclar ^{®46}

		tablety	
	imipenem	i.v. nebo i.m. injekce	Tienamycin [®]

3.2.2 Inhibitory syntézy mykolové kyseliny

Do této skupiny látek lze zařadit dvě prvoliniová antituberkulotika, izoniazid a pyrazinamid. Pyrazinamid má v této práci výjimečné postavení, proto mu budeme věnovat samostatnou kapitolu (viz kapitola 5.4). Dále sem patří ethionamid a prothionamid a nitroimidazoly, nová potenciální antituberkulotika ve fázi klinického ověřování (viz kapitola 4.1.1.3).

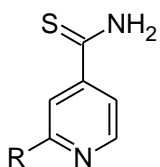
3.2.2.1 Izoniazid



Izoniazid

Izoniazid, hydrazid izonikotinové kyseliny, byl uveden do terapie v roce 1952⁴⁷, což jej činí prvním syntetickým, klinicky používaným antituberkulotikem. Již krátce po počátku jeho administrace byly nalezeny mykobakteriální kmeny, které jsou vůči tomuto léčivu rezistentní⁴⁸. Nicméně i přesto je dodnes nepoužívanějším léčivem v terapii TBC. Mechanismus jeho účinku byl detailně popsán, ve stručnosti se jedná, po aktivaci KatG katalasa-peroxidasa hemoproteinem (izoniazid je tudíž proléčivem), o inhibitor InhA, NADH dependentní enoyl-ACP reduktasy, která je zapojena především v syntéze mastných kyselin s dlouhým řetězcem⁴⁹. Tato fakta jsou potvrzena i studiem mechanismů rezistence, kdy byly u rezistentních kmenů objeveny mutace v genech kódujících zmíněné enzymy KatG a InhA⁵⁰. *In vitro* MIC se u kmenů citlivých na izoniazid pohybuje kolem 0,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Spektrum aktivity izoniazidu jsou bacily rodu *Mycobacterium*, především druhy *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. bovis*. Proti jiným mikroorganismům toto léčivo aktivní není, důvodem je odlišnost mykobakteriálního metabolismu, vysoká aktivita enzymu KatG a neefektivní systém efluxu léčiv. Je baktericidní u rychle rostoucích bacilů, avšak pouze bakteriostatické u bacilů rostoucích pomalu²⁹. Vzhledem k délce trvání léčby TBC jsou hledány takové způsoby formulace přípravků, které umožní snížení podávaného množství léčiva při současném zachování dostatečné účinnosti⁵¹.

3.2.2.2 Ethionamid, prothionamid



R = CH₂CH₃ - Ethionamid

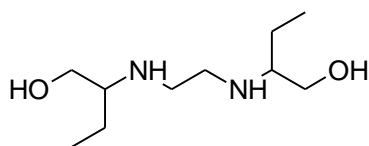
R = (CH₂)₂CH₃ - Prothionamid

Ethionamid a prothionamid jsou strukturní analoga, jedná se o 2-ethyl(propyl) pyridin-4-karbothioamid³⁸. Obě látky jsou perorálními léčivými druhy, opět pro léčivými, které působí jako inhibitory IlnA, NADH dependentní enoyl-ACP reduktasy⁵², ovšem jejich aktivace probíhá jiným způsobem. Enzymem aktivujícím tyto léčiva je pravděpodobně flavin monooxygenasa⁵³. Vzhledem k faktu, že se jedná o analoga, obě látky mají zkříženou rezistenci⁵⁴. Jejich MIC *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv byla stanovena na 0,25 μg.ml^{-1,55}. Použití obou léčiv jako druholiniových nabývá na významu s postupujícím rozšířením výskytu DR-TBC⁵⁶.

3.2.3 Inhibitory syntézy arabinogalaktanu a peptidoglykanu

Do této skupiny léčiv lze zařadit léčivo první volby etambutol, dále pak cykloserin, amoxicilin a klofazimin. V současné době se v této skupině objevily nové látky ve stádiích klinických nebo preklinických studií, např. SQ 109 (viz kapitola 4.1.1.5).

3.2.3.1 Ethambutol

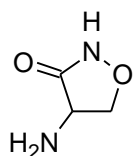


Ethambutol

Chemicky je etambutol *N,N'*-bis(1-hydroxymethylpropyl)-ethylen-diamin. Mechanismem účinku tohoto léčiva je inhibice arabinosyl transferas, které zabezpečují syntézu arabinogalaktamu a lipoarabinomannanu, ovšem přesný biochemický cíl tohoto léčiva není doposud přesně znám. O mechanismu účinku je usuzováno z genových mutací etambutol rezistentních izolátů⁵⁷. Arabinogalaktan a lipoarabinomannan jsou nedílnou součástí mykobakteriální

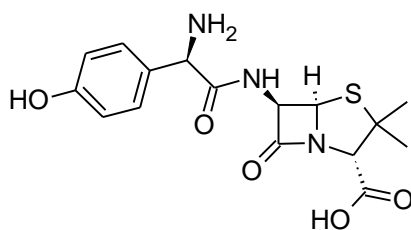
buněčné stěny. *In vitro* MIC proti *Mycobacterium tuberculosis* činí $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$.⁵⁵. Na základě zjištěné účinnosti tohoto diaminu bylo syntetizováno a otestováno přes 100 000 nových látek a některé z nich vykázaly srovnatelnou aktivitu jako etambutol, jako například deriváty piperazinu nebo homopiperazinu⁵⁸.

3.2.3.2 Cykloserin

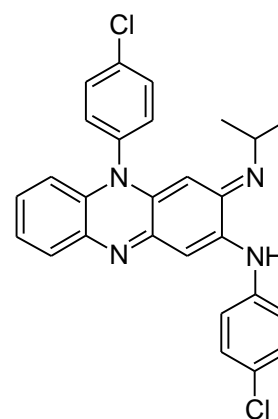


Chemicky jde o analog D-alaninu, z čehož vyplývá i mechanismus účinku této látky. Cykloserin je inhibítoem alanin racemasy a D-alanin D-alanin ligasy. Který ze zmíněných dvou enzymů je hlavním cílem zásahu tohoto léčiva zůstává doposud nerozluštěno⁵⁹. Tyto enzymy se starají o syntézu základního pentapeptidu obsahujícího právě D-alanin, který je nutný pro stavbu peptidoglykanu a tím pádem je potřeba při stavbě celé buněčné stěny⁵⁴. *In vitro* aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv byla stanovena na $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$.⁵⁵. Nevýhodou cykloserinu je díky velmi blízké podobnosti s neuroexcitačními aminokyselinami jeho prokázaná neurotoxicita⁶⁰. Tento problém způsobuje problematickou syntézu analog cykloserinu, i když publikace z poslední doby naznačuje jistou cestu jak tento problém obejít⁶¹.

3.2.3.3 Amoxicilin a klofazimin



Amoxicilin



Klofazimin

Na konec této kapitoly mohou být zmíněny tyto dvě léčiva. V obou případech se jedná o látky z poslední skupiny antituberkulotik (viz kapitola 3.2.1),

jejichž použití připadá v úvahu pouze při empirické léčbě rezistentních forem onemocnění.

Ve zkratce amoxicilin, jedno z nejnovějších β -laktamových antibiotik, má mechanismus účinku inhibici transpeptidasy, která se stará o zesílení postranních peptidových řetězců při syntéze peptidoglykanů a tím inhibuje syntézu buněčné stěny. Ovšem antimykobakteriální aktivita tohoto léčiva je velmi slabá⁶².

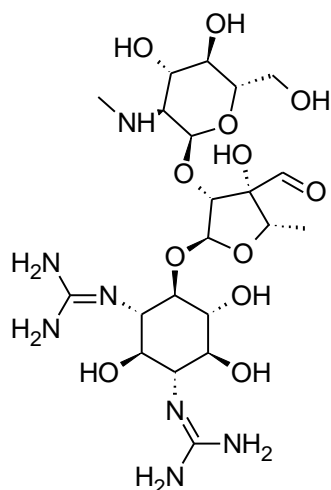
U klofaziminu a jiných riminofenazinů byla popsána aktivita především proti *Mycobacterium leprae*, od čehož bylo odvozeno jeho možné použití jako antituberkulotika. Mechanismus účinku předpokládá jakési porušení funkce buněčné membrány, nicméně do detailu není znám⁶³. V poslední době bylo publikováno několik variací na strukturu klofaziminu⁶⁴ a je možné, že díky zvýšenému zájmu o jeho strukturní analoga bude objasněn i mechanismus jeho účinku⁶⁵.

3.2.4 Inhibitory proteosyntézy

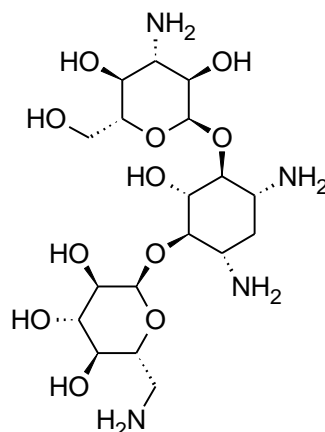
Do této skupiny lze zařadit velmi významná léčiva, která se uplatňují při terapii infekcí neodpovídajících uspokojivě na léčiva první volby. Jedná se o aminoglykosidová antibiotika streptomycin, kanamycin a amikacin a cyklická peptidová antibiotika mezi které můžeme zařadit kapreomycin a viomycin. Všechny zmíněné látky působí přes 30S subjednotku ribozomů. Dále můžeme do této skupiny zařadit klaritromycin a linezolid, které působí přes 50S podjednotku ribozomů.

Stručně budou probrány jednotlivé podskupiny dělené dle chemické struktury. Z pohledu vývoje nových léčiv jsou ribozomy jako místo zásahu léčiva velmi atraktivní a proto bylo v poslední době publikováno mnoho aktivních látek, které mají mechanismus účinku právě přes ovlivnění funkce těchto buněčných organel (viz kapitola 3.2.4.3).

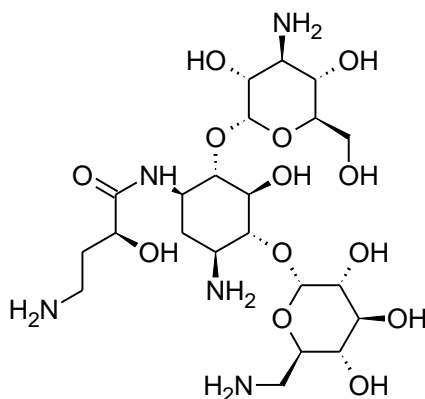
3.2.4.1 Aminoglykosidová antibiotika



Streptomycin



Kanamycin

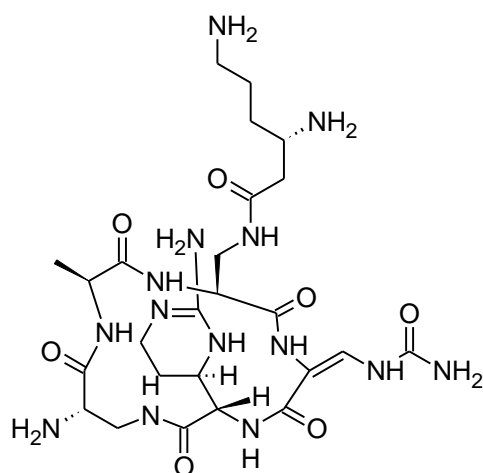
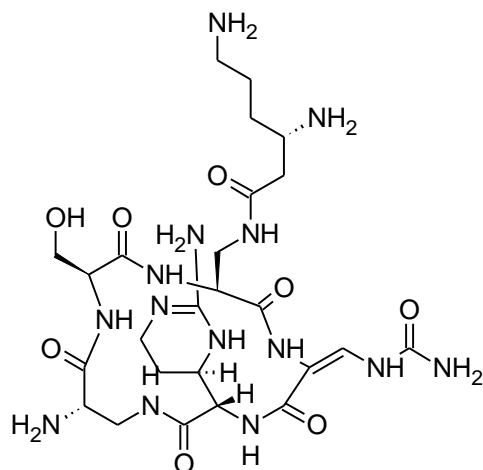


Amikacin

Mezi aminoglykosidová antibiotika používaná v léčbě TBC můžeme zařadit streptomycin, kanamycin a amikacin. Mechanismem jejich účinku je inhibice proteosyntézy vazbou na 30S podjednotku ribozomů⁶⁶. Zajímavé je, že přestože se jedná o velmi hydrofilní léčiva, velmi dobře překonávají lipofilní bariéru mykobaktérií, kterou je jejich buněčná stěna. Tento jev je možno vysvětlit tím, že v jejich transportu do intracelulárního prostoru hrají hlavní úlohu tzv. poriny⁶⁷. Poriny jsou transportní systémy mykobaktérií, které slouží pro transport hydrofilních nutrietů do buňky⁶⁸. Tento transportní systém je pro buňky natolik důležitý, že i u rezistentních mykobakteriálních kmenů nebyla zaznamenána jeho změna. V nedávné době pak byly publikovány studie popisující rentgenovou metodou cílové buněčné struktury kokrytalizované s účinnou látkou⁶⁹. Takovéto studie mohou v budoucnu vést k vývoji stejně účinných analog aminoglykosidů. Jistou překážkou pak může být zhoršení transportu přes poriny, díky změně

struktury účinné látky. Též díky vysoké reaktivitě může být značně komplikované připravit polysyntetická strukturní analoga.

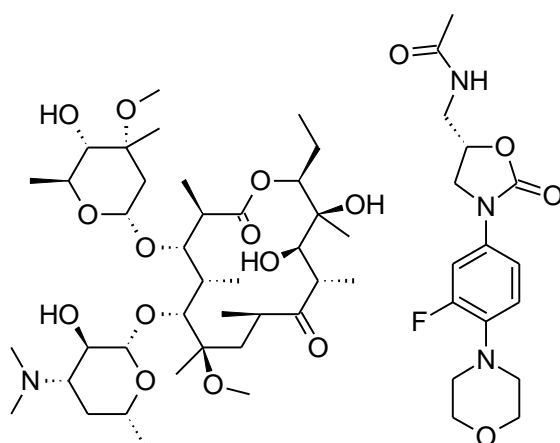
3.2.4.2 Peptidová antibiotika



Kapreomycin

Mezi peptidová antibiotika používaná v terapii TBC lze zařadit kapreomycin a viomycin. Pro tyto látky platí rámcově to samé, co bylo v předešlé kapitole zmíněno pro aminoglykosidy. Můžeme ještě dodat, že pokud se látky používají v kombinaci s léčivy ovlivňujícími funkci buněčné stěny⁷⁰, lze výrazně zvýšit jejich aktivitu, nebo dokonce zvrátit na ně vzniklou rezistenci.

3.2.4.3 Klaritromycin a linezolid



Klaritromycin

Linezolid

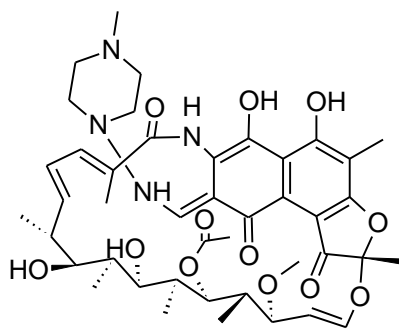
Klaritromycin je systematicky dle své struktury řazen mezi makrolidová antibiotika. Jeho *in vitro* aktivita proti mykobakteriím byla stanovena jako dobrá⁷¹, nicméně jeho aktivita *in vivo* se ukázala jako slabá⁷². Proto je ještě potřeba jeho význam a účinnost v terapii TBC prozkoumat a definitivně stanovit jeho zařazení v systému antituberkulotik. Jistou cestou ke zlepšení zmíněných negativních vlastností může být opět jejich podávání se synergisticky působícími látkami poškozujícími správnou funkci mykobakteriální buněčné stěny⁷³. Nedávno byly publikovány nové makrolidy, které mají zvýšenou aktivitu *in vitro* a jistou šanci na další postup směrem k účinnějším látkám jsou prováděné SAR studie. Na zřetel je potřeba vzít opět možné problémy s transportem látek do buněk i s problematickou polysyntetickou modifikací⁷⁴.

Linezolid je představitelem zcela nové strukturní skupiny antibakteriálních látek souhrnně označovaných jako oxazolidinony. V roce 2004 byl povolen americkou FDA k užití v terapii rezistentních infekcí způsobených Gram pozitivními bakteriemi. Jsou to první zcela syntetické látky ovlivňující funkci ribozomů⁷⁵. Díky očekávanému nástupu použití těchto látek provedlo mnoho firem SAR studie, ze kterých byly vybrány skutečně nadějně látky, např. ranbezolid, jenž má excelentní antibakteriální spektrum a který postoupil v roce 2004 do fáze 1 klinického ověřování⁷⁶. Použití oxazolidinonů jako léčiv proti TBC musí být dále detailněji zkoumáno.

3.2.5 Léčiva ovlivňující DNA procesy

Tato skupina léčiv je celkem rozsáhlá ve smyslu antibakteriálních látek. Ovšem co se týče látek antimykobakteriálních jde o několik aktivních léčiv a několik látek v klinických fázích ověřování. Lze sem zařadit dvě skupiny – ansamycinová antibiotika, ze kterých sem patří deriváty rifampicinu. Druhou skupinou uplatňující se více v léčbě bakteriálních infekcí jsou fluorochinolony. V terapii TBC hrají nedílnou úlohu při léčbě infekcí způsobených kmeny rezistentními na léčiva první volby. V běžné praxi jsou fluorochinolony druhé a třetí generace, další zástupci jsou v různých fázích klinických studií.

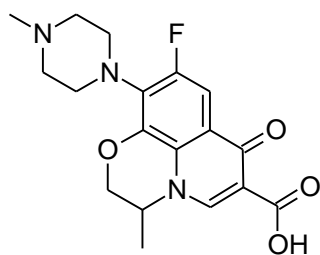
3.2.5.1 Ansamyciny



Rifampicin

Do této skupiny lze zařadit rifampicin, rifabutin a jejich analoga. Jedná se o antibiotika ze skupiny ansamycinů. Jde se o jedinou strukturní skupinu antibiotik ovlivňující procesy spojené s replikací DNA. Přesněji lze tyto látky popsat jako inhibitory β -podjednotky DNA dependentní polymerasy. I přes to že jde o jedinečnou skupinu látek, bylo zjištěno, že ne mnoho analog vykazuje lepší farmakologické vlastnosti nežli předlohovému rifampicinu. Strukturně optimalizační studie byly prováděny za cílem zlepšení jeho biologické dostupnosti. Bohužel snad kromě rifampentinu a rifametanu (která jsou v současné době ve fázi 2 klinického ověřování) nebyla nalezena struktura s vlastnostmi lepšími⁷⁷. Terapeuticky se jedná o velmi významná léčiva pro terapii TBC.

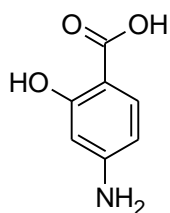
3.2.5.2 Fluorchinolony



Ofloxacin

Fluorchinolony zaujaly v posledních dvaceti letech velmi důležitou pozici mezi antibakteriálními chemoterapeutiky. Tato strukturní skupina léčiv zažívá bouřlivý rozvoj a hledání nových ještě účinnějších derivátů se širokým antibakteriálním spektrem přináší mnoho látek, jež jsou v současné době zařazeny v různých fázích klinických studií. Antibakteriální spektrum chinolonů velmi často zahrnuje i mykobaktéria. Ze starších již registrovaných látek můžeme jmenovat zástupce druhé generace ofloxacin, levofloxacin (levotočivý izomer ofloxacinu) a ciprofloxacin. Popis mechanismu účinku je zahrnut do kapitoly zabývající se novými fluorchinolony v různých fázích klinického ověřování (viz kapitola 4.1.1.1). MIC fluorchinolonů druhé generace *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv nepřesahuje 1 µg.ml^{-1,42}.

3.2.6 Inhibitory dihydrofolát reduktasy



p-aminosalicylová kyselina

Do této skupiny léčiv lze ze všech dnes používaných antituberkulotik zařadit *p*-aminosalicylovou kyselinu⁷⁸. Pravdou je, že dihydrofolát reduktasa mykobakterií má jisté strukturní odlišnosti od humánní⁷⁹, a proto je (alespoň teoretická) možnost selektivního zásahu mykobakteriálního enzymu. Na toto téma již bylo publikováno několik zajímavých prací, které naznačují, že tato cesta může být do budoucna zajímavou⁸⁰.

Co se týče samotné *p*-aminosalicylové kyseliny, její mechanismus byl studován mnoha skupinami, nicméně na jeho definitivní rozluštění se ještě čeká.

Jedna z teorií tvrdila, že dochází k redukci aktivity thymidylát reductasy, a tím k interferenci s hladinami folátu, druhá pak, že p-aminosalicylová kyselina interferuje s metabolismem salicylátů a následně pak dochází k poruše příjmu železa mykobakteriální buňkou. MIC p-aminosalicylové kyseliny *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv nepřesahuje 1 µg.ml^{-1,41}.

3.2.7 Farmakoterapie tuberkulózy citlivé na léčiva první volby

Nejprve je zapotřebí vzpomenout, že podstatně výhodnější strategií než léčba je v přístupu k vážným infekčním onemocněním jako TBC prevence. Preventivní přístup k této infekci začal již počátkem 20. století, kdy mikrobiologové Calmette a Guérin kultivovali kmen *Mycobacterium bovis*, který ztratil svoji virulenci pro lidi, ale jistou invazivitu si zachoval. K první vakcinaci člověka došlo v roce 1925. Po jejím schválení Ligou národů v roce 1928 se její použití velmi rozšířilo.

BCG vakcína je povinnou imunizací obyvatel v 64 státech a v dalších 118 je tato vakcína doporučována. Ve smyslu kontroly incidence tuberkulózy je to nejlepší způsob jak ji dostat pod kontrolu, popřípadě zcela eradikovat. Vakcína je snadno dostupná, levná a bezpečná.

Klinické studie na infekcích způsobených jinými kmeny nežli *M. tuberculosis* prokázaly, že takovéto infekce mohou způsobit vznik rezistence k pozdější infekci tímto kmenem. Umělá infekce BCG se rozšiřuje lymfatickým systémem do lymfatických uzlin, kde způsobuje infekci podobné primární infekci virulentními bacily. Vzniká tak buněčná rezistence, která je plně dovyvinuta zhruba šest týdnů po aktivní imunizaci. Mechanismus vzniku odolnosti vůči infekci je založen na potlačení přenosu infekce krví, je způsobena aktivací T-lymfocytů. Jde tedy nikoliv o protekci vůči nákaze, ale vůči vzniku akutní formy nemoci, nebo její reaktivaci. Tato aktivace působí u většiny lidí zhruba 15 let.

Studie, zabývající se sledováním snížení počtu výskytů jednotlivých typů tuberkulózy prokázaly, že v některých případech (především u rozptýlené formy zasahující více orgánů) dosahuje účinnost vakcince 80 %. Tento fakt ji řadí mezi nejvýznamnější přístup v kontrole tohoto onemocnění⁸¹.

Vzhledem k tomu, že mykobaktéria jsou velmi pomalu rostoucí organizmy, je potřeba začít léčbu TBC i v případě, že není ukončena kultivace sputa, ale pacient má objektivní diagnostické nálezy indikující infekci TBC. Velmi důležité je rychlé stanovení citlivosti kultivovaných bakterií na jednotlivá léčiva, která umožní případnou adaptaci použité farmakoterapie.

3.2.7.1 Terapeutická strategie

Běžně se ihned po vyšetření pacienta nasazuje čtyřkombinace léčiv (izoniazid, pyrazinamid, rifampicin, ethambutol), která se podává podle okolností denně, třikrát nebo dvakrát týdně po dobu dvou měsíců.

Po ukončení počáteční dvouměsíční terapie se provede znovu radiografické vyšetření plic a kultivace sputa. Pokud jsou plíce bez kavit a sputum negativní na rychle rostoucí bacily, přechází pacient na dvojkombinaci rifampicin izoniazid, která se podává třikrát nebo dvakrát týdně po dobu dalších 4 měsíců. Pokud je po dvou měsících sputum stále pozitivní na rychle rostoucí bacily, pokračuje se stejnou kombinací po dobu dalších sedmi měsíců. Etambutol je možno vysadit v momentě, kdy je ukončeno stanovení citlivosti bacilů na všechna léčiva. Pyrazinamid by se měl podávat po dobu alespoň dvou měsíců. Alternativou podávání rifampicinu je rifapentin, který je ovšem kontraindikován u HIV pozitivních pacientů.

Pokud jsou touto formou TBC nakaženi HIV pozitivní, léčba probíhá podle stejného algoritmu pouze s výše zmíněným rozdílem.

3.2.8 Farmakoterapie tuberkulózy rezistentní na alespoň jedno léčivo první volby (DR-TB a MDR-TB)

DR-TBC je definována jako infekce rezistentní na alespoň jedno léčivo první volby. Tato forma lze rozdělit podle druhu rezistence na zhruba 4 podtypy. Toto rozdělení je nutné kvůli správnému výběru následné farmakoterapie. Obecně lze pak říci, že infekce rezistentním kmenem mykobaktéria způsobí prodloužení léčby až na dva roky, kdy selhání compliance pacienta nebo chyba terapeuta může vést ke vzniku kmenů s rozšířenou rezistencí a vývoji tzv. XDR-TBC, což je život ohrožující infekce⁷.

3.2.8.1 Terapeutická strategie

Prvním krokem ke správné volbě účelné farmakoterapie je zjištění citlivosti bacilů na jednotlivá léčiva. Tak lze rozřadit DR-TBC do čtyř podtypů a volit další postup:

1/ rezistentní na izoniazid (\pm streptomycin, zkřížená rezistence), postupuje se tak, že se nasadí rifampicin, pyrazinamid a etambutol, ve zvláštních případech se může přidat jeden z fluorochinolonů (levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin). Léčba této formy může trvat minimálně 6 měsíců.

2/ rezistentní na izoniazid a rifampin (\pm streptomycin, zkřížená rezistence). Postupuje se tak, že se nasadí jeden z fluorochinolonů, pyrazinamid, etambutol, a injekční léčivo druhé volby (kanamycin, amikacin, kapreomycin, streptomycin⁹), případně ještě alternativní perorální druholiniové léčivo (ethionamid, prothionamid, cykloserin, terizidon, *p*-aminosalicylová kyselina). Trvání léčby tohoto typu DR-TBC je 18 – 24 měsíců.

3/ rezistentní na izoniazid, rifampicin (\pm streptomycin, zkřížená rezistence) a etambutol nebo pyrazinamid. Postupuje se tak, že se nasadí jeden z fluorochinolonů, pokud není rezistence pak buď pyrazinamid nebo etambutol, jedno z injekčních léčiv a dvě ze skupiny perorálních léčiv druhé volby. Trvání této léčby je nejčastěji 24 měsíců.

4/ rezistentní na rifampicin. Postupuje se tak, že se nasadí pyrazinamid, izoniazid a etambutol, v případě potřeby se může přidat jeden z fluorochinolonů.

Ve všech zmíněných případech je potřeba zvážit chirurgický zásah (odstranění nejpostiženější tkáně).

3.2.9 Farmakoterapie tuberkulózy rezistentní na většinu konvenčních antituberkulotik (XDR-TB)

Od té doby, co byla poprvé popsána, forma XDR-TBC se objevila ve více než 42 zemích šesti kontinentů. Už při prvotní diagnóze je potřeba důsledně zvážit anamnézu pacienta (relapsy a způsob jejich léčby) a epidemiologické údaje z oblasti jeho života. Vážnou roli hraje též pacientův blízký kontakt s jinými nakaženými lidmi. Léčba je podstatně složitější než u pacientů s MDR-TBC a extrémně složitá u pacientů s koinfekcí HIV, přitom zhruba 10 % všech případů MDR-TBC je klasifikováno jako XDR-TBC. U HIV pozitivních pacientů je

dosaženo vyléčení u méně než 2 % pacientů, u HIV negativní pak tato hodnota osciluje okolo 50 %. Zatím bylo sesbíráno velmi málo údajů k tomu, aby mohl být vytvořen obecně platný terapeutický postup, v každém případě je doporučována individuální forma péče.

3.2.9.1 Terapeutická strategie

Panel expertů doporučil následující postup ve farmakoterapii.

1/ Použij jakékoliv léčivo ze skupiny léků první volby, u kterého je šance že bude účinné.

2/ V každém případě použij injekční léčivo druhé volby (zvaž možnost, že bude podáváno 12 měsíců a možná i po celou dobu léčby). Pokud je pacient rezistentní na všechna léčiva, uvaž možnost použití takového, které ještě nikdy neměl.

3/ Přidej jeden z pozdější generace fluorochinolonů, například moxifloxacin.

4/ Použij všechna léčiva ze skupiny druhé volby která nebyla použita při předešlé léčbě, nebo ta, u kterých je naděje že budou účinná.

5/ Uvaž možnost použití léčby vysokými dávkami izoniazidu i když je dokumentována rezistence na dávky nižší.

6/ rozhodni, jestli je infekce lokalizovaná⁹

7/ Rozhodni o možnosti chirurgického zásahu v případě, že infekce lokalizovaná je.

8/ Současně se snaž léčit HIV.

9/ Zajisti kompletní monitoring pacienta a dodržování léčby.

4 Přehled současného stavu řešené problematiky

4.1 Vývoj nových antituberkulotik

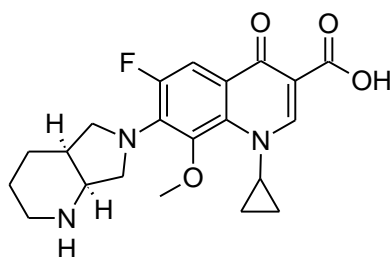
Vzhledem ke zmíněným epidemiologickým faktům o zvyšování počtu výskytů rezistentních forem TBC (viz kapitola 3.1.2), došlo k ustanovení výzkumných priorit veřejného i soukromého výzkumu v oblasti nových antituberkulotik (viz kapitola 3.1.3). Během posledních deseti let tak došlo k ohromnému posunu této oblasti bádání a mnoho léčiv pokročilo do vysokých fází klinického ověřování⁶⁵.

4.1.1 Léčiva ve fázích 1-3 klinických studií

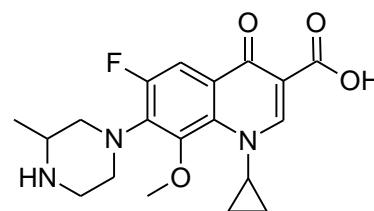
Léčiva která jsou v 1.-3. fázi klinického ověřování můžeme rozdělit podle základní chemické struktury takto:

- 1/ Fluorochinolony – moxifloxacin a gatifloxacin
- 2/ Diarylchinolin – TMC207
- 3/ Nitroimidazoly – OPC7683 a PA824
- 4/ Pyrrol – LL3858 (Sudoterb[®])
- 5/ Diamin – SQ109¹⁵

4.1.1.1 Fluorochinolony



Moxifloxacin



Gatifloxacin

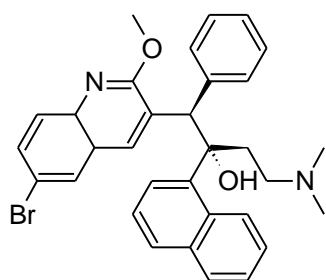
Proti TBC působící fluorochinolony jsou jen malým procentem z rychle rostoucí skupiny nově zkoumaných antiinfektiv, čítající v současné době nejméně 22 látek. Jejich objev souvisí s identifikací jedné nečistoty, která se objevila jako znečištění jedné šarže při výrobě nalidixové kyseliny. Následoval prudký výzkum této skupiny látek a jejich rozsáhlé použití na poli antibakteriálních chemoterapeutik⁸². Novější generace fluorochinolonů má výhodnější vlastnosti

z pohledu redukce vedlejších a nežádoucích účinků, zjednodušení dávkování a rozšířené antibakteriální aktivity, která zasahuje i mykobaktéria. U mnoha z nich je studována antimykobakteriální aktivita a je jen otázkou času, kdy dojde k výběru těch nejaktivnějších. Mechanismus jejich účinku je duální inhibice ATP dependentní gyrazy (topoizomerasy II) a ATP dependentní topoizomerasy IV⁸³. Detailní mechanismus účinku fluorochinolonů na molekulární úrovni je nadále studován. V případě mykobaktéria jde jen o inhibici topoizomerasy II, jelikož mykobaktéria topoizomerasu IV nemají⁸⁴. U některých derivátů je síla inhibice mykobakteriální topoizomerasy II pouze střední, ale v preklinických studiích jsou látky mající cca. 10ti násobnou aktivitu než dnes používané fluorochinolony moxifloxacin a gatifloxacin⁸⁵.

Zhruba v poslední dekádě došlo i přes nedostatek objektivních klinických dat k extenzivnímu rozšíření použití fluorochinolonů v terapii TBC. V poslední době je věnována pozornost použití fluorochinolonů při léčbě poprvé diagnostikovaného onemocnění, které je citlivé na léčbu první volby. V tomto případě je studován vliv na zkrácení celkového trvání léčby. Velký příspěvek k tomu přineslo indické výzkumné centrum v Chennai⁸⁶. Zmíněná studie publikovala následující fakta: při zkrácení terapie o měsíc za použití ofloxacinu v první fázi léčby došlo k výskytu relapsu pouze u 4 % pacientů. Tyto údaje jsou velmi nadějně už vzhledem k tomu, že novější moxifloxacin a gatifloxacin jsou potentnějšími antituberkulotiky než zmíněný ofloxacin⁸⁷.

Moxifloxacin a gatifloxacin jsou vyvíjeny ve spolupráci Grantové agentury Evropské komise, TB Aliance při WHO a firmami IRD a Lupin. Obě látky jsou ve fázích 2-3 klinické studie. Látky jsou studovány jako potenciální léčiva pro zkrácení terapie TBC citlivé na léky první volby, jak již bylo zmíněno. Bylo prokázáno, že sterilizační aktivita v kombinaci s rifampicinem a pyrazinamidem je u infikovaných myší velmi vysoká⁸⁸. Metodika studia těchto látek zahrnuje i studium tzv. brzké baktericidní aktivity.

4.1.1.2 Diarylchinolin – TMC 207

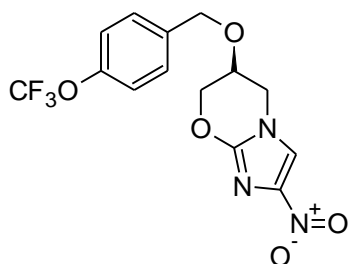


TMC207

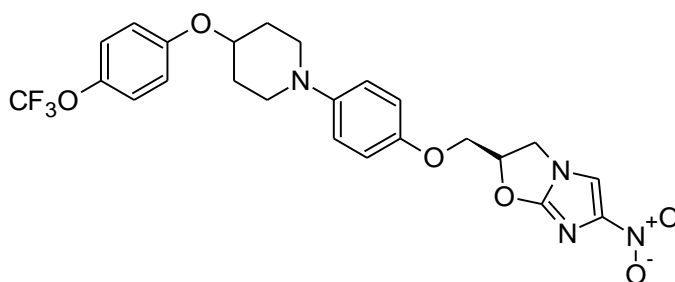
První publikace popisující excelentní antimykobakteriální aktivitu diarylchinolinu proti mnoha mykobakteriálním kmenům vyšla v roce 2004 a byla publikována Andriesem a kol. z firmy Johnson & Johnson⁸⁹. V současnosti byla ukončena 1. fáze klinického ověřování. Byla zjištěna dobrá tolerance a biologický poločas okolo 24 hodin. Tato látka má mechanismus účinku v inhibici F_0F_1 podjednotky proton dependentní ATP syntasy. V závislosti na tomto objevu se rozvinula další aktivita v hledání dalších možných inhibitorů zmíněného enzymu.

V této souvislosti může zaujmout fakt, že antimalarikum meflochin, u kterého je známá jistá antimykobakteriální aktivita⁹⁰, inhibuje proton dependentní ATP syntasu u *Streptococcus pneumoniae*⁹¹. V neposlední řadě je potřeba zmínit mnoho derivátů chinolinu s publikovanou antimykobakteriální aktivitou a dosud nevyjasněným mechanismem účinku⁹²⁻⁹⁴. Na první pohled jsou v publikovaných strukturách jisté podobnosti, ale to zda mají všechny v této kapitole zmíněné látky stejný mechanismus účinku je potřeba ještě dorešit.

4.1.1.3 Nitroimidazoly – OPC7683 a PA824



PA824



OPC7683

Jelikož byla u některých derivátů prokázána velmi solidní antimykobakteriální aktivita, je současné době celkem velký zájem o vývoj těchto struktur jako potenciálních antituberkulotik. Dvě z těchto struktur jsou k dnešnímu dni v klinické fázi studií. Jedná se o látku PA824, která je vyvíjena konsorciem při TB Aliance a OPC7683, kterou vyvíjí Otsuka Pharmaceutical.

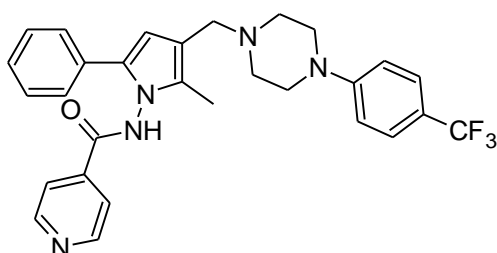
Historie těchto látek sahá do 70. let minulého století, kdy Ciba-Geigy India vyvinula první nitroimidazol jako radiosenzitizující agens. Zároveň bylo prokázáno že deriváty nitroimidazolu mají významnou antibakteriální aktivitu a jejich spektrum zahrnuje i mykobaktéria. Bohužel bylo později prokázáno, že zmíněné struktury vykazují mutagenitu v Amesově testu a v 80. letech bylo od jejich dalšího vývoje upuštěno. Pauza ve vývoji trvala cca do 90. let, kdy malá firma Pathogenesis přišla s novými strukturálními typy, nitroimidazo-oxaziny a nitroimidazo-pyrany.

Firma Pathogenesis studovala více než 700 sloučenin, ze kterých byla vybrána PA824 jakožto nejvíce potentní⁹⁵. Tato látka byla studována na mutagenitu, avšak nejen Amesovým testem, ale i testy na chromozomální aberace, nebo testy na změnu jadérek u myši¹⁵. Licence na tuto látku byla postoupena TB Aliance, která dokončila fázi 1 klinických studií.

Novější derivát OPC 8673 je vyvíjen jako specifický proti TBC. Látka je též důsledně prověřována na mutagenicitu. Výsledky všech studií jsou zatím negativní.

Mechanismem účinku těchto dvou nitroimidazolů je inhibice syntézy mykolové kyseliny⁶⁵. Všechny tyto látky jsou proléčivý, aktivní forma vzniká teprve po enzymatické redukci nitroskupiny⁹⁶. Dále bylo prokázáno, že nitroimidazoly působí aktivně i na nerostoucí bacily, a to intracelulární produkcí NO⁹⁷.

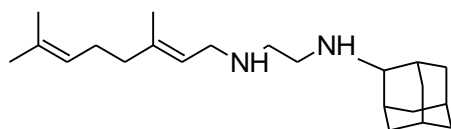
4.1.1.4 Pyrrol – LL3858 (Sudoterb[®])



LL3858

Pyrrol LL3858 je v současné době testován firmou Lupin v první fázi klinického ověřování jako součást kombinované terapie. Antituberkulotická aktivita derivátů pyrrolu byla poprvé publikována Deiddaou a kol⁹⁸. Firma Lupin syntetizovala řadu látek, z nichž právě LL3858 má nebyvale vysokou aktivitu (méně než jednotky mikromolů na litr) a v kombinaci s jinými antituberkulotiky vykazuje excelentní baktericidní aktivitu¹⁵.

4.1.1.5 Diamin – SQ109



SQ109

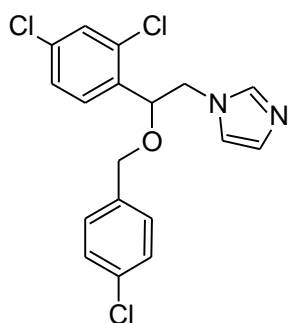
Tento diamin je vyvíjen firmou Sequella a jedná se o *N*-substituovaný derivát adamantylaminu. Původně byl připravován jako analog etambutolu⁹⁹, ale jeho strukturní odlišnost naznačuje, že se může jednat o zcela novou aktivní látku s novým mechanismem účinku. Tato látka prošla preklinickými studiemi (MIC u myši 0,1 - 0,63 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)¹⁰⁰ a vstoupila do fáze 1 klinického ověřování. Mechanismus jejího účinku zatím nebyl zcela objasněn.

4.1.2 Nové cíle možného zásahu mykobaktérií a nadějně struktury v preklinických fázích vývoje

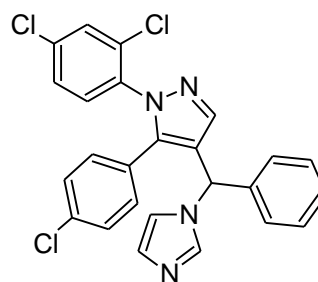
Zde je potřeba poznamenat, že za posledních 10-15 let narostl ohromně zájem o vývoj nových antituberkulotik, proto též došlo k významnému zvýšení publikační aktivity na téma nových antituberkulotik, která je výsledkem screeningu velkého množství chemických látek.

Zmínit všechny látky, které mají slibnou antimykobakteriální aktivitu *in vitro*, a jsou na počátku preklinického screeningu by vysoce přesáhlo únosný rozsah této práce, proto budou v následujících dvou kapitolách probrány látky, které se dostaly do stádia „lead“ podle schématu racionálního vývoje nových léčiv¹⁰¹. Výjimka bude učiněna u analogů pyrazinamidu, která budou studována podrobněji.

4.1.2.1 Inhibitory mykobakteriální cytochrom P450 monooxygenasy



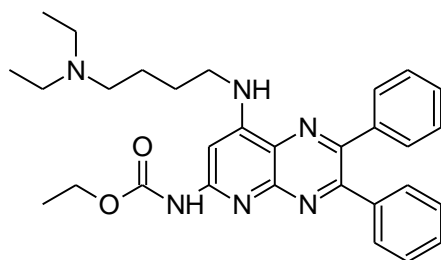
Ekonazol



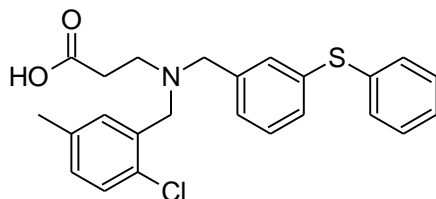
Substituovaný imidazol

Z výsledků screeningu mnoha látek s anthelmintickou nebo antifungální aktivitou vplynuly zajímavé závěry¹⁰². Léčiva jako ekonazol nebo klotrimazol byly v centru zájmu jako potenciálně aktivní proti mykobaktériím¹⁰³. Je pravděpodobné, že se jedná o inhibitory P450 monooxygenasy homologní eukariontním 14-steroldemethylasam. V nich se váže na železo, jelikož se jedná o hem obsahující enzymy¹⁰⁴. Ekonazol vykázal *in vitro* antimykobakteriální aktivitu, která byla potvrzena testem na myším modelu *in vivo*. V poslední době bylo publikováno mnoho látek obsahujících imidazolové jádro, jež je bohatě substituované, a které jsou antimykobakteriálně aktivní, se shora zmíněným mechanismem účinku¹⁰⁵.

4.1.2.2 Látky cílíící na enzym FtsZ



SRI3072



Inhibitor FtsZ

Enzym s názvem FtsZ je mykobakteriálním analogem tubulinu, tedy proteinem naprosto nezbytným pro úspěšné dělení buněk¹⁰⁶. Inhibitory polymerace tubulinu vykazaly jistou antimykobakteriální aktivitu. Například anthelmintika albendazol a thiabendazol, jež inhibují polymeraci tubulinu u hlístů, vykazaly i slabou aktivitu proti mykobakteriím. Bylo provedeno několik studií, které hledaly specifické inhibitory FtsZ, které přinesly jisté výsledky. Tuto aktivitu vykazal i derivát taxanu nebo látky původně navržené jako inhibitory dihydrofolát reduktasy¹⁰⁷. Nicméně přesný mechanismus fungování mykobakteriálního FtsZ není zcela objasněn a je předmětem dalšího studia¹⁰⁸.

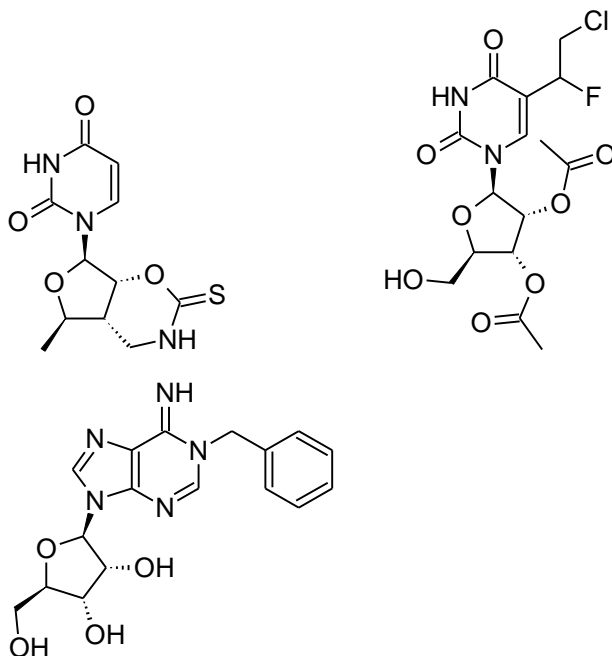
4.1.2.3 Inhibitory syntézy aminokyselin s rozvětveným řetězcem



Některé herbicidy, jako například sulfometuron (methylester), které inhibují syntézu aminokyselin s rozvětveným řetězcem, vykazaly jistou inhibiční aktivitu proti mykobakteriím¹⁰⁹. Novější studie popsala inhibitor mykobakteriální syntézy

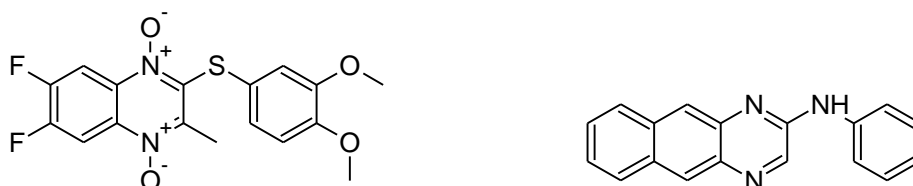
acetohydroxyhydroxy kyselin. Další látka byla objevena rozsáhlým screeningem knihoven organických látek¹¹⁰.

4.1.2.4 Inhibitory nukleosidmonofosfát kinasy



Mykobakteriální thymidinsyntasa je dosti odlišná od té humánní (pouze 22 % homologie), což ji činí dobrým cílem selektivního zásahu léčiv¹¹¹. Z tohoto důvodu se tento enzym stal atraktivním cílem počítačově založených studií, hledajících jeho inhibitor. Jedná se například o thymidinová analoga, která byla testována, bohužel s nepříliš dobrým výsledkem¹¹². Jiná studie přinesla celkem zajímavé výsledky s látkami analogickými pyrimidinovým bazím¹¹³. Byla připravena i analoga purinových bazí s jistou aktivitou, nicméně přesný mechanismus účinku je nejasný.

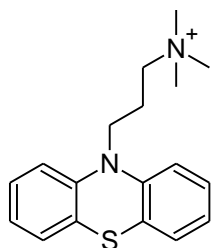
4.1.2.5 Inhibitory signální kinasy



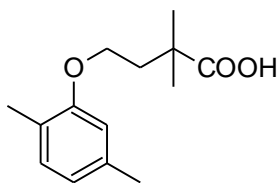
Nejen tloušťka mykobakteriální stěny, ale i mykobakteriální kinasy jsou obranou těchto organismů proti fagocytóze mikrořagy. Extenzivní výzkum inhibitorů těchto kinas může vést k nové skupině antimykobakteriálně aktivních látek¹¹⁴.

Jednou ze skupin, jež mohou mít zmíněnou aktivitu, jsou salicylanilidy¹¹⁵, jejichž výzkum je prováděn na KAOCH FaF UK. Další skupinou látek pak jsou sloučeniny odvozené od benzothiofenu nebo benzochinoxalinu¹¹⁶. Další skupinou látek, kterou lze zařadit do této skupiny jsou inhibitory tyrozin fosfatasy, které lze chemicky definovat jako cyklické peptidy. Zásah signálních kinas je dobrým přístupem ve vývoji nových antituberkulotik, přestože se nemusí jednat o látky baktericidní ani bakteriostatické, mohou svým mechanismem velmi zesílit imunitní odpověď organismu na probíhající infekci.

4.1.2.6 Inhibitory různého mechanismu

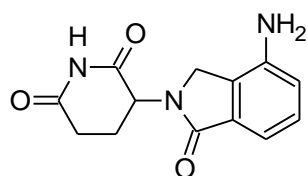


Publikované slabé účinky fenothiazinu na inhibici růstu mykobaktérií vyústil v rozsáhlejší zájem o látky se stejným účinkem na bacily. Jedná se o inhibitory typu II NADH menachinon oxidoreduktasy¹¹⁷.



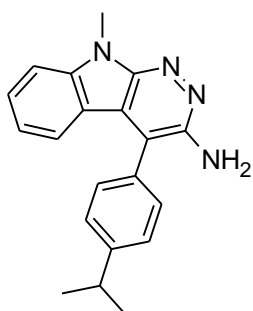
Gemfibrozil

Gemfibrozil, terapeutikum používané při léčbě hyperlipidémie je induktorem proliferace peroxizomů. Výzkum mechanismu působení této látky na mykobakteria může přinést další účinné látky působící oxidoredukčním mechanismem¹¹⁸.



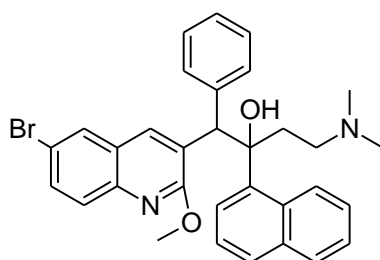
Thalidomid

Dále byla publikována studie analoga thalidomidu s imunomodulačním účinkem na experimentální tuberkulózní meningitidu, která přinesla jisté naděje, že výzkum imunomodulatorního účinku thalidomidu může pomoci při hledání nové skupiny antiinfektiv¹¹⁹.



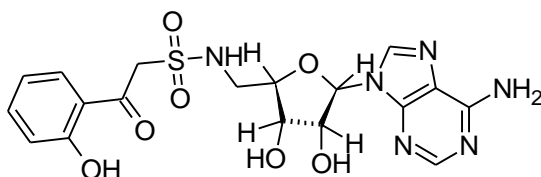
Inhibitor MAO

Jistá korelace mezi antimykobakteriální aktivitou a inhibicí MAO byla popsána již v 60. letech minulého století. Nicméně bylo potřeba provést rozsáhlou SAR analýzu, ze které vyplynula níže uvedená látka jako dobrý kandidát s aktivitou v řádech jednotek $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.¹²⁰



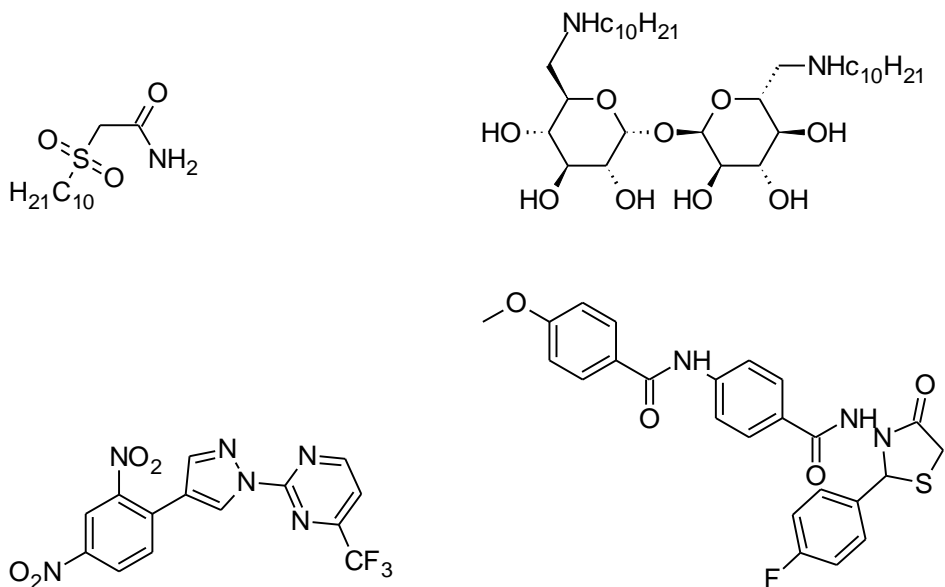
R207910

Inhibitory ATP dependentní protonové pumpy. Tato struktura byla publikována celkem nedávno, má excelentní MIC proti mnoha mykobakteriálním druhům, pohybující se v rozsahu 0,03 – 0,12 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.¹²¹



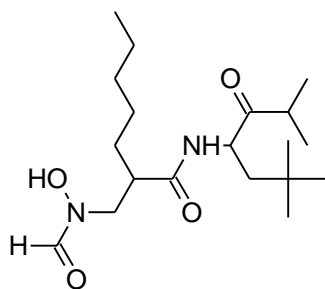
Inhibitory syntézy sideroforů.

Siderofory jsou velmi významnými součástmi bakteriálních buněk, které zabezpečují získávání železa z buď nerozpustných anorganických látek, nebo z železo obsahujících proteinů hostitele. Siderofory tak patří k významným virulentním faktorům mnoha patogenů. Níže uvedená látka má MIC na kultuře *M. tuberculosis* 0,19 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.^{1,122}.



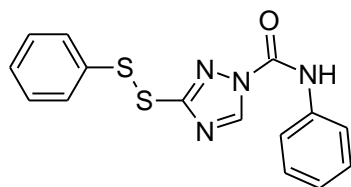
Inhibitory syntézy buněčné stěny

Zde je nutno podotknout, že každá z látek zasahuje jinou část procesů sloužících ke stavbě mykobakteriální buněčné stěny, nicméně jejich finální efekt patrně způsobuje nedostatečnou funkčnost pro mykobakterium zcela nepostradatelné organely.



BB3497

Inhibitory deformylasy peptidů. Tento bakteriální enzym zabezpečuje odštěpení formylu z N-konce nově syntetizovaných peptidů. Níže uvedená látka byla vybrána díky jedné SAR studii, která poskytla 6 aktivních sloučenin a též díky skríningu těchto šesti látek na 17ti mykobakteriálních kmenech, přičemž medián její aktivity na těchto kmenech je 0,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.^{1,123}.



KHG20612

Inhibice syntasy acetohydroxykyselin. Tento enzym je velmi významný pro syntézu aminokyselin s rozvětveným řetězcem, jako jsou leucin, izoleucin, nebo valin. Zmíněný inhibitor vyšel ze skríningu asi 5 600 látek, přičemž byla publikována jeho aktivita ve formě IC_{50} při koncentraci $1,8 - 2,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$.¹¹⁰

4.1.2.7 Antimykobakteriální látky bez popsání mechanismu účinku

Do této skupiny lze zařadit publikované deriváty karbazolu a dibenzofuranů. Poslední dosud publikovanou skupinou jsou látky přírodního původu jako je např. basiliskamid A, pamamycin 607 nebo lydiamycin A.

4.1.2.8 Další možné cíle zásahu nových léčiv

Vzhledem k faktu, že byl kompletně popsán mykobakteriální genom, za posledních 20 let došlo k mohutnému rozvoji proteomiky a genomiky, jsou objevovány nové a nové cíle možného selektivního zásahu mykobaktérií.

Zvláště velké komplikace přináší útlum metabolismu mykobaktéria, který je patrně způsoben imunitou hostitele a kódován v mykobakteriálním genomu, a je jedním z hlavních virulentních faktorů tohoto bacilu. Během útlumu a též při experimentální kultivaci v anaerobních podmínkách bacil „přepne“ metabolismus tak, že místo sacharidů začne více využívat lipidy jako zdroje energie, díky up-regulaci transkripce genů kódujících enzymy β -oxidačního cyklu. S aktivací dormantní fáze života bacilu souvisí pravděpodobně též transkripční regulátor DosR, který je up-regulován, je-li bacil vystaven působení reaktivních forem kyslíku nebo NO. Je možné, že jeho zásahem se podstatně sníží virulence celého bacilu.

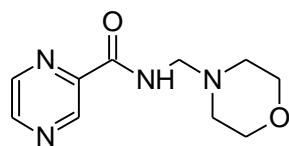
Dalším cílem, jež dosud nebyl zasažen žádnou novou látkou, je enzym syntetizující cyklopropylované mykolové kyseliny. Ty jsou velmi důležitým virulentním faktorem, jak již bylo zmíněno dříve.

Obecným cílem pak může být protein, který ovlivňuje syntézu proteinů, zvaný „stringent response protein“. Tento byl izolován a v současné době je s ním pracováno ve smyslu rozpoznání jeho aktivních center a detailního popisu jeho funkce.

Posledním popsáním možným cílem je zásah systému toxin-antitoxin. To jsou enzymy, které jsou přítomny v bakteriální buňce po celou dobu jejího života, ale působí proti sobě antagonistickým způsobem. V momentě kdy je jejich transkripce nestejněměrná, dochází k buněčné smrti¹²⁴.

Z celé kapitoly je patrné, že došlo k ohromnému rozvoji výzkumu nových antimykobakteriálně působících látek. Bylo nalezeno mnoho makromolekulárních cílů zásahu těchto látek, ale největším problémem stále zůstává jednoznačně účinný zásah dormantních bacilů. V jejich zásahu je dle našeho názoru naděje k plné kontrole onemocnění TBC na celém světě, neboť celá třetina obyvatel naší planety v sobě takového bacila nosí. Pokud budou nalezeny opravdu účinné léky, pak za předpokladu dostatečné politické a ekonomické podpory programů bojujících proti TBC může dojít k vymáčení této zdlouhavé a lidské životy beroucí nákazy.

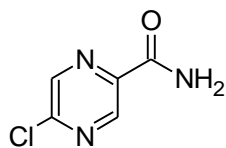
4.1.3 Deriváty pyrazinamidu s publikovanou antimykobakteriální aktivitou



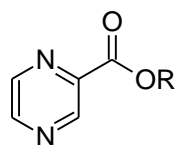
Morfazinamid

Na tomto místě je potřeba zmínit v první řadě morfazinamid. Tato látka je prekurzorem pyrazinamidu. V bakteriální buňce se rozkládá na pyrazinamid, formaldehyd a morfolin. Jeho antimykobakteriální aktivita je totožná s pyrazinamidem, nicméně je aktivní i v neutrálním prostředí a též proti tzv. netuberkulózním mykobakteriím jako je *Pseudomonas*, *Proteus vulgaris* nebo *Staphylococcus aureus*. Tento jev je patrně způsoben uvolňováním toxického formaldehydu, jelikož morfolin tuto aktivitu postrádá. Zajímavý je fakt, že *in vitro*

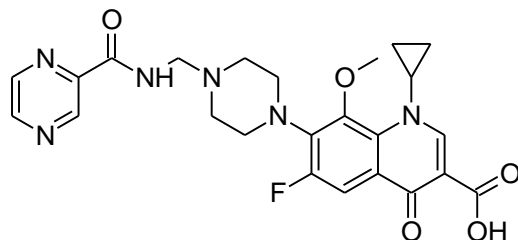
studie ukazují vyšší aktivitu morfazinamidu nežli pyrazinamidu¹²⁵, *in vivo* modely pak říkají pravý opak¹²⁶. Pravděpodobné vysvětlení tohoto děje je patrně méně výhodná farmakokinetika než má pyrazinamid.



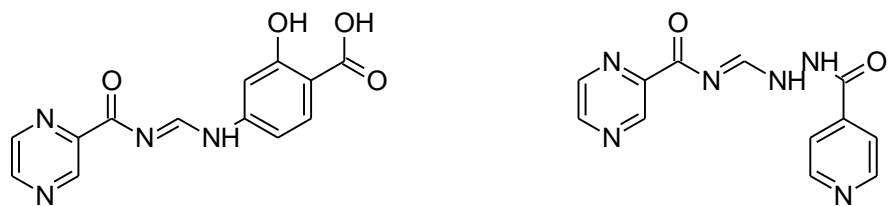
Druhým důležitým analogem, který přispěl k významnému posunu v popisu mechanismu účinku pyrazinamidu je 5-chloropyrazinamid. Bylo objasněno, že zmíněná látka působí nejspíše jako inhibitor enzymu FAS-1¹²⁷, tedy odlišně od pyrazinamidu samotného. Důkazem je zachování antimykobakteriální aktivity proti pyrazinamid rezistentním kmenům. Zbývá ještě dovysvětlit, zda dochází k metabolické přeměně tohoto amidu na karboxylovou kyselinu stejně tak, jak tomu je u pyrazinamidu. Dalším povzbuzujícím zjištěním je fakt, že 5-chloropyrazinamid je aktivní i proti *Mycobacterium smegmatis*, kdežto pyrazinamid samotný nikoliv¹²⁸.



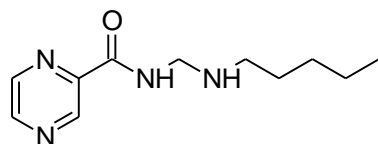
Další kapitolou aktivních derivátů pyrazinamidu jsou jeho estery. K jejich vývoji došlo na základě objevu aktivity pyrazinkarboxylové kyseliny proti pyrazinamid rezistentním kmenům. Ke tvorbě esterů bylo přistoupeno z důvodu zvýšení jejich biologické dostupnosti a jejich *in vitro* testování přineslo naději, že jejich aktivita bude dobrá¹²⁹. Nicméně selhaly *in vivo* experimenty, pravděpodobně díky špatné stabilitě těchto látek v organismu.



V nedávné době byla publikována skupina derivátů pyrazinamidu vzniklá Mannichovou kondenzační reakcí¹³⁰.

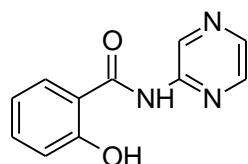


Slibnou aktivitu i relativně široké terapeutické okno při testování *in vitro* vykazují substituované pyrazinkarbonyliminomethyl deriváty¹³¹.



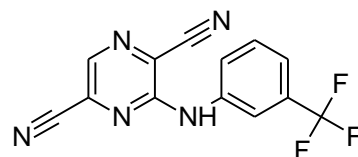
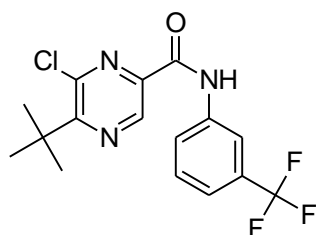
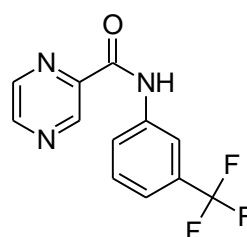
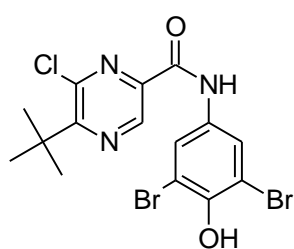
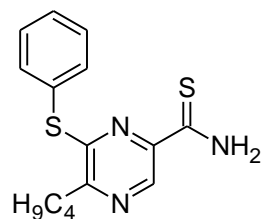
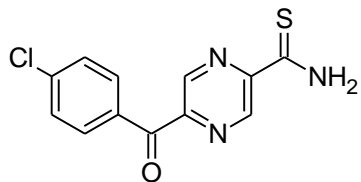
Podstatně horší aktivitu opublikoval Chung a kol. u substituovaných *N*-aminomethyl derivátů pyrazinamidu, respektive 5-methylpyrazinamidu¹³².

Zajímavé je, že všechny publikované látky mají podobnou podstatnou část molekuly.



Místo v této kapitole najdou i deriváty salicylanilidů, které byly zmíněny již dříve (viz kapitola 4.1.2.5). U těchto látek je zajímavý fakt, že nejaktivnější ze série syntetizovaných derivátů mají v anilidové části molekuly substituci pyrazinylem. Tato analogie přivádí k otázce, zda je předpokládaným mechanismem účinku těchto látek právě inhibice signální kiny, nebo zda nejde o analogii mechanismu účinku např. 5-chlorpyrazinamidu.

A posledními, nikoliv však nejméně významnými jsou analoga pyrazinamidu připravená na KFCHKL FaF UK doc. Doležalem a kol., ze kterých jsou vybrány látky se slibnou aktivitou¹³³⁻¹³⁸.



5 Vývoj nových léčiv proti tuberkulóze na KFCHKL FaF UK

5.1 Již publikovaná fakta

Vývoj nových léčiv proti TBC je dlouhodobým tématem, které je na FaF UK řešeno. KFCHKL je pracovištěm, které zabezpečuje syntézu nových látek s potenciální anti-TBC aktivitou.

Zvolená cesta řešení tohoto problému je syntéza analog jednoho z nejběžněji používaných léčiv, prvoliniového pyrazinamidu. Za poslední dvě dekády bylo publikováno množství článků, které popisují způsob přípravy a biologickou aktivitu analog pyrazinamidu¹³⁹. I přesto, že doposud nebyl přesně vysvětlen mechanismus účinku PZA, ukázalo se, že nejen samotný PZA, ale i některá jeho analoga vykazují střední až vysokou anti-TBC aktivitu. Byly nalezeny látky, které postoupily v rámci skríningu TAACF, s nímž má FaF UK podepsanou smlouvu o spolupráci, do vyšších úrovní screeningu.

Tématika anti-TBC látek byla již od 90. let minulého století podporována grantovými agenturami a v rámci KFCHKL bylo úspěšně obhájeno několik grantů, které tuto problematiku řešily¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

5.2 Vymezení tematiky a její zařazení do vědecko-výzkumných souvislostí KFCHKL FaF UK

Zvolenou tematikou je syntéza analog pyrazinamidu, které obsahují kromě pyrazinového ještě další aromatické jádro. Jedná se tedy o další druh analog PZA, což zapadá do dlouhodobé vědecké práce prováděné na KFCHKL FaF UK.

5.3 Způsob řešení tématu

Autorův podíl na řešené tematice spočívá především v přípravě nových strukturních analog pyrazinamidu a zavedení nových separačních technik do syntetických postupů vedoucích k meziproductům, které slouží jako substrát pro nově připravované látky. Tyto látky jsou poté předány k dalším biologickým analýzám.

5.3.1 Vymezení tématu z pohledu chemického

Na základě již nabytých znalostí o chemii pyrazinového jádra (viz kapitola 5.4.3 a 5.4.4) připravit sérii analog PZA s obecnou strukturou 3-arylamino-pyrazin-2,5-dikarbonitril, popřípadě *N*-arylpyrazin-2-karboxamid, alternativně pak 6-chloro-5-*tert*-butyl-*N*-arylpyrazin-2-karboxamid. Takovéto deriváty strukturně charakterizovat všemi dostupnými strukturně-analytickými metodami (FT-IR, ¹H, ¹³C NMR, CHN analýza, případně MS). Po identifikaci struktury pak látku charakterizovat fyzikálně-chemicky za použití HPLC (čistota, log *P*).

5.3.2 Flash Chromatografie

Sloupcová preparativní chromatografie je metodou, která má ze všech známých chromatografických technik nejnižší rozlišení. Velmi často dochází k překryvu v eluci jednotlivých látek, velmi nevýhodný je poměr množství vložené směsi ku množství potřebného sorbentu pro úspěšnou separaci čistých látek.

Vzhledem k tomu, že flash chromatografie je velmi běžně využívanou metodou preparativní chromatografie v laboratorním měřítku, přičemž není mnoho dostupné literatury popisující tuto techniku a její aspekty, autor si dovoluje na příkladu separace tří polohových izomerů tuto metodu představit a popsat její hlavní aspekty.

Literatura tvrdí, že oproti konvenčnímu uspořádání sloupcové chromatografie je flash chromatografií dosahováno lepšího, v rámci dělení chromatografických technik středního rozlišení. Ke zlepšení dochází díky sice malému, ale přesto určitému vloženému tlaku na kolonu, díky němuž se zkracuje doba kontaktu vzorku se sorbentem, eluční píky se zostřují a mají strmější křivku nárůstu koncentrace již ve velmi nízkých koncentracích. Tuto účinnost ještě podstatně zvyšuje gradientová eluce¹⁴⁵. V našem technickém řešení bylo možno použít pouze gradient krokový.

Proto bylo přistoupeno k využití instrumentální flash chromatografie za použití přístroje Flash Master[®] Personal firmy Argonaut Technologies Inc., (Foster City, CA, USA).

5.3.3 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Hodnocení antimykobakteriální aktivity byly prováděny dvěma na sobě nezávislými laboratořemi, a to při Fakultní nemocnici v Hradci Králové a díky smlouvě o spolupráci mezi FaF UK a TAACF, což je součást NIAID zřízené americkým NIH.

V Hradci Králové prováděla testování MUDr. Michaela Svobodová z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Testování v rámci TAACF probíhá zdarma na základě zaslání vzorku spolupracující straně. Přes web pak lze sledovat postup jejího testování. Ve zkratce lze metodiku hodnocení v rámci TAACF popsat takto:

V září 1994 založil americký NIAID program vývoje a testování nových antituberkulotik.

Program je určen k intenzifikaci skrínungu (kvantity i kvality) *in vitro* a *in vivo* testů s cílem otestovat co největší počet strukturních typů potenciálních antituberkulotik. Tato služba je bezplatná a případná komercializace výsledků je ponechána poskytovateli sloučenin. Díky této podpoře akademického výzkumu a napojení na firemní výzkum lze předpokládat urychlení vývoje nových antituberkulotik.

Primary Assay Data (Level 1) – všechny sloučeniny jsou testovány proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv v koncentraci 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky jsou udávány v % inhibice. Sloučenina je považována za aktivní, jestliže vyvolá inhibici větší než 90%.

MIC Assay Data (Level 2) – sloučeniny s inhibicí větší než 90% jsou dále testovány při nižších koncentracích pro stanovení přesné minimální inhibiční koncentrace (MIC), vyvolávající 99% inhibici růstu bakterií.

Cytotoxicity Assay Data (Level 2) – sloučeniny jsou testovány na zjištění toxicity (buněčná linie VERO). Index selektivity (SI) je definován jako poměr změřené IC_{50} v systému VERO buněk k zjištěné hodnotě MIC.

Macrophage Assay Data (Level 3) – vybrané sloučeniny jsou testovány *in vitro* v modelu TB-infikovaného makrofágu. Je sledována redukce růstu residuálních mykobaktérií po dobu 7 dnů ve srovnání s kontrolou (bez sloučeniny). EC_{90} a EC_{99} pak vyjadřují koncentrace způsobující 90% a 99% redukci růstu residuálních mykobaktérií.

SDRMIC Assay Data (Level 3) – test je určen pro zjištění zkřížené resistance vůči mykobaktériu.

M. avium MIC Assay Data (Level 3) – zjištění aktivity vůči uvedenému kmenu

MBC Assay Data (Level 3) – minimální baktericidní koncentrace

Ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové byly látky testovány *in vitro* na účinnost proti *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* No. 152/73, *M. avium* No. 80/72 a *M. kansasii* PKG 8 na tekuté Šulově půdě zředovací metodou ve srovnání s pyrazinamidem při pH 5,4. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu v koncentracích 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky byly odečítány po dvou a třech týdnech. Aktivita PZA se liší *in vitro* v závislosti na kyselosti půdy, na jejím složení i velikosti inokula. Hodnoty MIC pro PZA se v literatuře pohybují v rozmezí od 6,25 do 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.3.4 Hodnocení antifungální aktivity

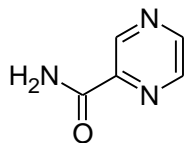
Doplňkově byly nově syntetizované deriváty pyrazinu testovány *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody^{146, 147}. Aktivita látek byla porovnávána s aktivitou standardu ketokonazolu vůči jednotlivým kmenům.

Vybrané sloučeniny byly testovány na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové doc. RNDr. Vladimírem Buchtou, CSc.

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufovaný na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (Sigma). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975 μM . Součástí testování byly jednak slepé pokusy (bez účinné látky), jednak určení aktivity standardu (ketokonazol) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 48 a 72 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon ashaii* 1188,

Trichophyton mentagrophytes 445, *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272.

5.4 Pyrazinamid



Pyrazinamid

Pyrazinamid je druhým syntetickým léčivem, které bylo uvedeno do terapeutické praxe. Počátek výzkumu antituberkulotické aktivity tohoto léčiva spadá do 50. let minulého století. Jeho objev souvisí s poznatkem, že niacinamid, vitamín B₃, je schopen jisté inhibice růstu mykobaktérií. Tento poznatek byl poprvé publikován v roce 1945 Chorinem a kol. Další práce jiných skupin tento fakt potvrdily¹⁴⁸. Po tomto zjištění následovala studie, hledající analogické struktury struktury niacinamidu a zanedlouho poté, v roce 1952, publikoval Malone a kol. první práci zaměřenou na antituberkulotickou aktivitu pyrazinamidu¹⁴⁹. Tuto práci ještě stejný rok potvrdila práce jiné skupiny, kterou zveřejnil Solotorovskij a kol¹⁵⁰. Je zajímavé, že prováděné studie přinesly bohaté ovoce ve formě dalších velmi důležitých antituberkulotik izoniazidu a ethionamidu.

Jedním z velkých paradoxů pak je, že přes jednoznačnou aktivitu pyrazinamidu *in vivo*¹⁵¹, je jeho aktivita *in vitro* v klasickém uspořádání experimentu téměř nulová¹⁵². Toto paradoxní chování pyrazinamidu bylo předmětem intenzivního výzkumu po dalších 50 let.

Další zajímavostí je, že od objevu aktivity pyrazinamidu do jeho uvedení do klinické praxe trvalo nezvykle krátkou dobu. Důvodem je to, že krátce po objevu této struktury bylo přistoupeno rovnou k *in vivo* studiím na myších modelech bez předchozího, dnes již bezpodmínečně nutného, screeningu *in vitro*.

Tyto paradoxy vedly k intenzivnímu výzkumu, který se zabýval zjištěním podmínek, které mohou tento paradox způsobovat. Z provedených studií pak vyplynulo, že pyrazinamid je aktivní pouze v kyselém prostředí, nejlépe okolo pH 5,5¹⁵³. Takové prostředí většinou nebylo zajištěno při pokusech *in vitro*, nicméně se velmi často vyskytuje v organizmu v místě výskytu zánětu.

Dále bylo zjištěno, že vysoké dávky pyrazinamidu v kombinaci s izoniazidem mohou vést ke „sterilizaci tkání“, tedy nemožnosti kultivovat nebo izolovat živá mykobaktéria¹⁵⁴. Nicméně bylo zjištěno, že z organismu není možné zcela eradikovat pomalu rostoucí nebo spící mykobaktéria, které mohou po skončení léčby způsobit relaps onemocnění. Tatáž výzkumná skupina poprvé publikovala fakt, že pyrazinamid je s největší pravděpodobností proléčivem a aktivní formou je pyrazinkarboxylová kyselina, která vzniká až v mykobaktériu metabolickou přeměnou enzymem pyrazinamidasou / nikotinamidasou (přesněji viz kapitola 5.4.2.2)¹⁵².

5.4.1 Farmaceuticko-chemické vlastnosti pyrazinamidu

Pyrazinamid je látka relativně polární. Její Log P činí -1,884. Je rozpustný v chloroformu, benzenu nebo dichlormethanu, částečně je pak rozpustný ve vodě. Teplota tání krystalů činí u čisté substance 192 °C³².

5.4.2 Farmakologické vlastnosti pyrazinamidu

Pyrazinamid je se svým životním příběhem celkem výjimečným léčivem. Sic prvoliniové léčivo používané při terapii závažné infekce, přec nebyly některé jeho farmakologické vlastnosti dodnes uspokojivě vysvětleny, Jedná se především o mechanismus jeho účinku na molekulární a submolekulární úrovni. Samotné jeho uvedení do klinické praxe je argumentem zpochybňujícím moderní přístup vývoje nových léčiv, především prvotního high throughput screeningu *in vivo* za „standardních“ podmínek.

5.4.2.1 Farmakokinetika

Pyrazinamid je u lidí velmi dobře absorbován z GIT, na plazmatické bílkoviny se váže zhruba z 10-20 % a prostupuje excelentně přes hematoencefalickou bariéru (85-105 % aktuální plazmatické koncentrace). Metabolizován je v játrech mikrozomální deaminasou na kyselinu pyrazinkarboxylovou. Vylučován je ledvinami. Distribuován je do všech tělních tekutin i orgánů³².

5.4.2.2 Farmakodynamika (mechanismus účinku)

I přesto, že je pyrazinamid významným antituberkulotikem, jeho mechanismus účinku je poznán snad nejhůře ze všech antituberkulotik.

Ve zkratce je předpokládán mechanismus takovýto: Jako pyrazinamid je přijat mykobaktériem, uvnitř jehož buňky dojde k enzymatické přeměně na pyrazinkarboxylát, který je následně aktivním efluxem vypuzen zpět mimo buňku¹⁵⁵. V kyselém prostředí, které existuje v místě zánětu, pak dojde k částečné protonaci karboxylátu (pKa pyrazinkarboxylové kyseliny je 2,9) v závislosti na aktuální hodnotě pH v intersticiu, vzniku pyrazinkarboxylové kyseliny, která prostupuje difúzí zpět do mykobakteriální buňky. Zde pak dochází ke kumulaci pyrazinkarboxylové kyseliny díky nedostatečnému mechanismu jejího efluxu, snížení intracelulárního pH tím dojde ke snížení vitality enzymů, případně vyčerpání energetických zásob díky snaze buňky udržet fyziologické podmínky, což má za následek buněčnou smrt. Tuto teorii podporuje fakt, že v neutrálním prostředí je pyrazinamid téměř neaktivní (protože je drtivá většina molekul pyrazinkarboxylové kyseliny ve formě karboxylátu), kdežto v kyselém prostředí je pyrazinamid aktivní¹⁵³. V následujícím textu budou podrobněji rozebrány aspekty uptake pyrazinamidu mykobakteriální buňkou, aktivita pyrazinamidasy / nikotinamidasy, mechanismus efluxu pyrazinkarboxylové kyseliny a potenciální cíle dalšího zásahu této kyseliny v mykobaktériích.

Nikotinamidasa/pyrazinamidasa je enzym metabolizující nikotinamid/pyrazinamid na příslušné kyseliny. Přičemž nikotinamid metabolizuje účinněji nežli pyrazinamid. Je lokalizována v mykobakteriální cytoplazmě. Tento enzym se vyskytuje pouze u prokaryontních organismů. Stojí za zmínku, že přes univerzální přítomnost v prokaryotech, ostatní bakterie nejsou citlivé na pyrazinamid. Funkce pyrazinamidázy / nikotinamidázy spočívá v metabolismu niacinamidu na niacin, který je následně využit pro syntézu NADH Preiss-Handlerovou cestou, kterou využívá mnoho bakteriálních druhů. Na rozdíl od ostatních bakterií je výskyt enzymu této cesty, niacin fosforibosyl transferasa u *Mycobacterium tuberculosis* deficitní. Tohoto rozdílu se využívá při rozlišení *M. tuberculosis* od *M. bovis*, protože při kultivaci prvního druhu dochází k hromadění niacinu v kultivačním médiu.

Mechanismus uptake pyrazinamidu mykobaktériem je prvním z kontroverzních jevů, který nebyl doposud jednoznačně vysvětlen. Jedna skupina došla k závěru, že vstup pyrazinamidu do buňky probíhá pasivní difúzí, Druhá skupina předpokládá vstup pyrazinamidu do buňky na základě kompetice s niacinamidem prostřednictvím ATP-dependentního aktivního transportního mechanismu. Možnost, že obě dvě cesty mohou být současně využity je nevyvrácena, ale ani nepotvrzena. Nicméně obě skupiny řešící tuto problematiku se shodly na tom, že pyrazinamid citlivá mykobaktéria hromadí ^{14}C pyrazinamid uvnitř buňky, zatímco kmeny rezistentní na PZA (díky mutaci genu kódujícího nikotinamidasu/pyrazinamidasu) žádnou kumulaci radioaktivity uvnitř buňky nevykazují¹⁵⁶. Vysvětlením může být fakt, že citlivé kmeny metabolizují pyrazinamid na pyrazinkarboxylovou kyselinu, která se chová v neutrálním prostředí jako anion a kumuluje se v buňce, kdežto kmeny s poškozeným enzymem toto nedokáží a pyrazinamid je pasivní difúzí odstraňován z buňky a tím ke kumulaci radioaktivity uvnitř buněk nedochází.

Rezerpin jako známý inhibitor efluxu u mnoha rezistentních bakterií¹⁵⁷ se ukázal být aktivním i v případě efluxu pyrazinkarboxylové kyseliny¹⁵⁵. Publikovaná studie prokázala zvýšenou citlivost mykobaktéria k pyrazinamidu za přítomnosti rezerpinu, zatímco citlivost k pyrazinkarboxylové kyselině změněna nebyla¹⁵³. Dalším faktem, který byl zjištěn v této studii je to, že valinomycin, který ruší membránový potenciál vliv na citlivost mykobaktéria vůči pyrazinamidu ani pyrazinkarboxylové kyselině neměl. Tyto indicie naznačují, že pyrazinamid může být transportován do buňky aktivně.

Posledním bodem nejasnosti je vazba pyrazinamidu nebo pyrazinkarboxylové kyseliny na nějaké buněčné struktury, obecněji řečeno specifita nebo nespecifita účinku pyrazinamidu. Studie, jež použila 5-chlorpyrazinamid ukázala, že je možné, že pyrazinamid samotný inhibuje syntasu mastných kyselin, přesněji enzym FAS-1¹⁵⁸. Tato publikace vyvolala mnoho otázek^{127, 159, 160} a experimentálních snah, které nakonec vyvrátily její pravdivost. Na základě kultivace rezistentních mutantů na 5-chlorpyrazinamid a porovnání jejich genomu s mutanty rezistentními na pyrazinamid bylo jednoznačně prokázáno, že v případě 5-chlorpyrazinamidu skutečně dochází k mutacím v genu kódujícím FAS-1, zatímco u pyrazinamid rezistentních kmenů není tato

mutace pozorována. Zbývá dořešit otázka, zda je prokazatelně vznikající metabolit, pyrazinkarboxylová kyselina, účinná specificky nebo nespecificky. Pro nespecifickou aktivitu hovoří fakt, že nebyly dosud izolovány mykobakteriální kmeny rezistentní na pyrazinkarboxylovou kyselinu, přičemž kmeny rezistentní na pyrazinamid existují¹⁵⁶. Dalším argumentem pro nespecifitu účinku je fakt, že pyrazinkarboxylová kyselina je aktivní pouze v kyselých podmínkách, v neutrálních nikoliv. Nicméně je možné, že pokud dojde k protonaci karboxylátu a vzniku karboxylové kyseliny, dojde k vazbě této protonované formy na tolik buněčných cílů, že mykobakterium zkrátka nemá šanci přežít. Tuto otázku je potřeba ještě dořešit¹⁴⁸.

5.4.2.3 Mechanismus vzniku rezistence

Mechanismem mykobakteriální rezistence na pyrazinamid je z převážné většiny případů mutace v *pncA* genu¹⁵⁶, který kóduje pyrazinamidazu/nikotinamidazu^{161, 162}. Zajímavé je, že pyrazinamid rezistentní kmeny nejsou rezistentní na jiná antituberkulotika, i když se jedná o strukturně velmi příbuzné látky jako je například izoniazid nebo ethionamid. Jiný mechanismus rezistence zatím nebyl popsán.

5.4.3 Chemické vlastnosti pyrazinového jádra a možné reakce na něm

V této části práce jsou uvedeny vybrané metody příprav na jádře substituovaných funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny. Důraz je kladen především na postupy, které byly využity při experimentální práci. Kapitoly jsou děleny jednak z hlediska charakteru reakcí probíhajících na pyrazinovém jádře, ale též podle typu funkčních skupin, které lze nalézt u jednotlivých meziproductů a konečných látek.

5.4.3.1 Kondenzační reakce vedoucí k pyrazinu

Přestože výchozí látkou byl komerčně dostupný pyrazinkarboxamid, bylo by vhodné zde alespoň některé způsoby přípravy pyrazinového jádra. Toto jádro lze připravit buď autokondenzací α -aminokarbonylových sloučenin nebo kondenzací α -diaminů s α -dikarbonylovými sloučeninami¹⁶³. Těmito způsoby lze

získat směs různě substituovaných derivátů pyrazinu. Novějším příkladem je příprava 3-alkoxy- a 3-aminopyrazin-2-karbonitrilů¹⁶⁴.

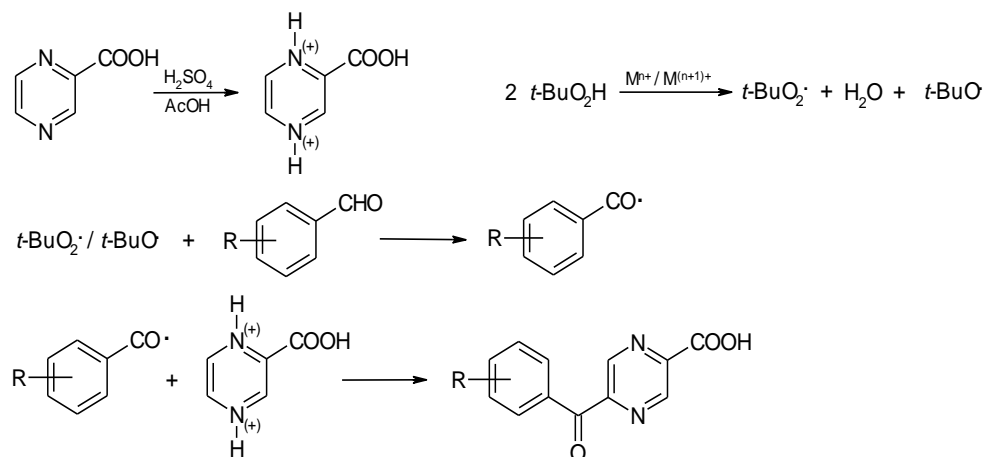
5.4.3.2 Reakce pyrazinového jádra

Pro přípravu různých substituovaných derivátů pyrazinu jsou vhodné homolytické substituční reakce. Charakter substituentu prvního substituentu vázaného na pyrazinovém jádře rozhoduje o místě navázání dalšího substituentu. Skupiny s +M efektem (např. Cl, OCH₃, NH₂) upřednostňují substituci do polohy *ortho*, čímž vznikají 2,3-disubstituované deriváty¹⁶⁵. Substituce do polohy *para* probíhá tehdy, je-li první přítomný substituent s –M efektem (např. CONH₂, COCH₃). Pak vznikají 2,5-disubstituované deriváty pyrazinu.

5.4.3.2.1 Homolytická acylace

Homolytická acylace (aroylace) pyrazinu je metoda která slouží k zavedení karbonylové skupiny přímo na elektronově deficitní dusíkaté heteroaromatické sloučeniny, které jsou k Friedel-Craftsovým aromatickým substitucím inertní.

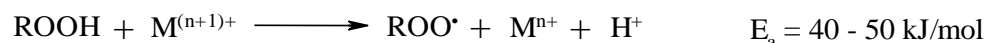
Zdrojem aroylradikálů jsou aromatické aldehydy, které předávají vodíkový atom *tert*-butyloxyradikálům. Tyto radikály vznikají reakcí *tert*-butylhydroperoxidu s ionty kovů. Vzniklé, mezomerně stabilizované, nukleofilní aroylradikály mohou aroylovat *N*-hetareny s vysokou reaktivitou a selektivitou. Reakce se obvykle provádí ve zředěné kyselině sírové, čímž je *N*-hetaren v roztoku k dispozici v protonizované formě¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Mechanismus radikálové aroylace v prostředí H₂O, AcOH, H₂SO₄ lze vysvětlit takto¹⁶⁹:



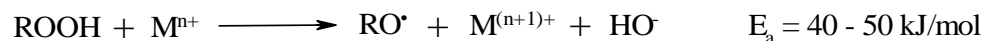
Radikálová aroylace je svým principem homolytickou řetězovou oxidací v homogenní fázi, jež je katalyzovaná ionty kovů¹⁷⁰. Katalyticky aktivní jsou kovy, které se vyskytují ve více oxidačních stavech ($\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$, $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$).

Tvorbu radikálů z peroxidů je pak možno rozlišit dle reakčního prostředí (pravděpodobně však vznikají oba možné radikály, liší se pouze poměrným zastoupením):

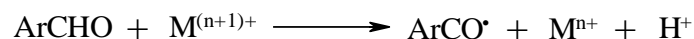
polární rozpouštědla (voda, kyselina octová): katalyzátor je ve formě iontových komplexů (sírán, acetát), redox reakce probíhají především přes transfer ligandů:



nepolární rozpouštědla: kovy jsou v kovalentně vázané formě (naftenát), redox reakce probíhají především přes transfer elektronů:



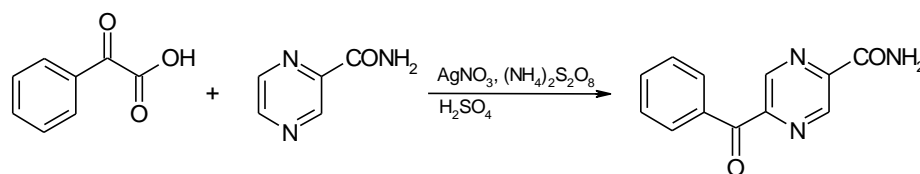
V nepolárním prostředí jsou vyšší oxidační stavy kovů redukovány aldehydy:



Pokud je přítomna více než jedna reaktivní pozice na jádře azinu mohou vznikat mimo mono- také diacylprodukty, jelikož acylací se reaktivita hetarenového systému zvyšuje.

V protikladu s tímto tvrzením je skutečnost, že vzniklé aroylhetareny jsou méně bazické než výchozí *N*-hetareny a při odpovídajících rozdílech bazicity se produkty deprotonují, čímž se u nich snižuje reaktivita. Je možné, že u monosubstituovaných derivátů pyrazinu budou platit obdobná pravidla, která formuloval Houminer pro homolytickou acylaci. Přítomnost karboxylové (rovněž tak amidové a nitrilové) skupiny na pyrazinovém jádře má jednak protektivní funkci proti diaroylaci jádra a zároveň aktivuje pyrazinový skelet pro radikálový nukleofilní atak. Tento postup byl úspěšně vyzkoušen i na našem pracovišti¹⁷¹⁻¹⁷³.

Další metoda aroylace (acylace) spočívá v jiném zdroji acylradikálů. Využívá α -ketokyselin v prostředí kyseliny persírové za katalýzy stříbrných iontů^{174, 175}.



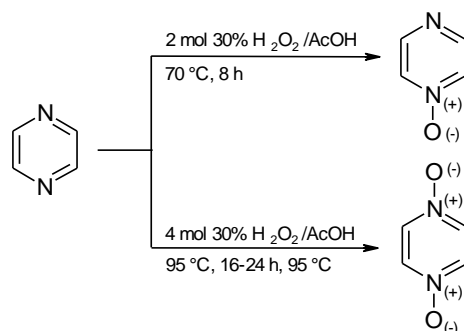
Při použití pyrazin-2-karboxamidu jako výchozí látky je tak možno dojít k 5-acylpyrazin-2-karboxamidu. Reaktivita a selektivita těchto acylací umožněná nukleofilním charakterem acylradikálu je v protikladu k tradiční elektrofilní aromatické acylaci. Selektivita reakce závisí opět na substituentu na pyrazinu, tzn. že substituenty s -M efektem řídí radikál do polohy 5.

5.4.3.2.2 *N*-oxidace

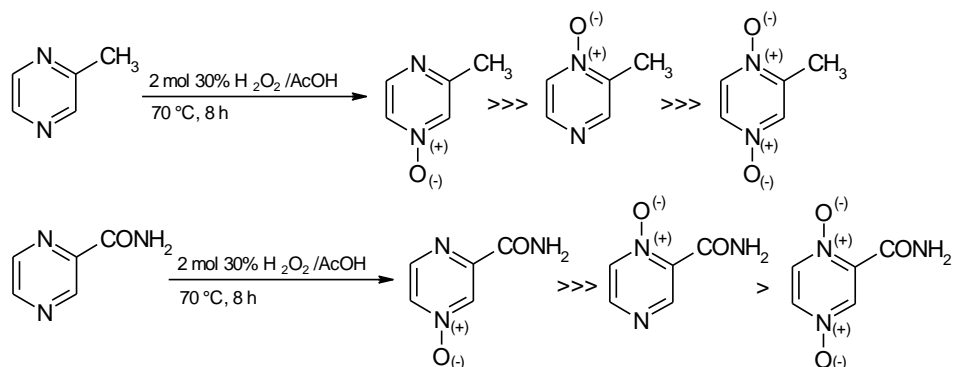
Pyrazin nepodléhá snadno elektrofilní substituci. Mnohem lépe na pyrazinovém jádře probíhají substituce nukleofilní, především tehdy, je-li pyrazinový kruh aktivován převedením na *N*-oxid.

V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci peroxidu vodíku přechází pyrazin na 1-mono- nebo 1,4-dioxid¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Bernardi¹⁷⁹ připravil 3-karboxypyrazin-1-oxid působením 2,5 molárního přebytku peroxidu vodíku na pyrazinamid v prostředí kyseliny octové. Podobně připravil Uchimaru¹⁸⁰ 3-(4-morfolinokarbonyl)-pyrazin-1-oxid a Okada 3-chlorpyrazin-1-oxid, z něhož dále získal 3-methoxypyrazin-1-oxid. Přípravou *N*-oxidů pyrazinových derivátů se zabýval rovněž Foks¹⁸¹⁻¹⁸³.

Při peroxidaci dvěma moly peroxidu vodíku však vždy dostáváme směs produktů. Pokud je pyrazinové jádro substituováno, vzniká „1-oxid i 4-oxid“ a v malé míře i 1,4-dioxid pyrazinu.

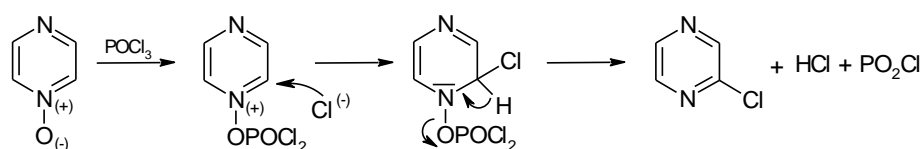


Regioselektivita *N*-oxidace je pak dána vlastnostmi substituentu¹⁸⁴. Třebaže peroxidace je adice elektrofilu (formálně OH⁺), činidlo neatakuje pozici s maximální elektronovou hustotou, tzn. že pyrazin substituovaný silnou elektrondonorovou skupinou (+M: CH₃, NH₂) se bude oxidovat především na atomu dusíku vzdálenějším od této skupiny za vzniku 3-substituovaného pyrazin-1-oxidu. Podobný fenomén byl pozorován i u ostatních diazinů. Dostáváme tedy podobné zastoupení jednotlivých regioizomerů jako při peroxidaci pyrazinu substituovaného skupinou s -M efektem. Reaktivita těchto jednotlivých odlišně substituovaných regioizomerů se však významně liší (viz kapitola 5.4.3.2.3).



5.4.3.2.3 Halogenace pyrazinového jádra

Halogenpyraziny jsou důležitou skupinou sloučenin v chemii derivátů pyrazinu, protože mohou poskytovat díky snadné substituci atomu halogenu za nukleofil řadu jinak nedostupných derivátů. Halogenované deriváty pyrazinu lze připravit třemi klasickými způsoby. První metoda spočívá v přímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi, druhá pak v záměně hydroxyly či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejčastěji se halogenderiváty pyrazinu získávají nukleofilní halogenací *N*-oxidů pyrazinu¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Halogenace takto aktivovaného jádra probíhá zejména do polohy 2, méně pak do polohy 3. Z halogenačních činidel se nejčastěji využívá chlorid fosforylu (níže je uveden obecný mechanismus chlorace nesubstituovaného pyrazin-*N*-oxidu pomocí chloridu fosforylu).



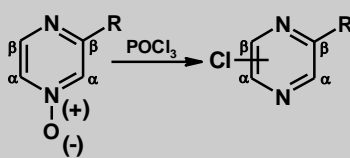
Podle japonských autorů¹⁸⁹ závisí výsledek chlorace na jádře 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů pomocí chloridu thionylu, chloridu fosforylu nebo acetylchloridu na charakteru substituentů. Substituenty s -M efektem určují u 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů vstup atomu chloru především do polohy 6. Za současné deoxygenace tak vznikají 2,6-disubstituované pyraziny. Substituenty s +M efektem řídí vstup atomu chloru zejména do polohy 3, vznikají tedy 2,3-disubstituované pyraziny. U substituentů se slabým +M efektem vzniká směs 2,3- a 2,6-disubstituovaných derivátů pyrazinu.

Poznatky v této oblasti shrnul Sato¹⁹⁰, podle kterého místo vstupu chloru u 3-substituovaného pyrazin-1-oxidu při reakci s chloridem fosforylu je ovlivněno nejen charakterem substituentů, ale i reakční dobou. Kromě reakce 3-aminopyrazin-1-oxidu s chloridem fosforylu je ve všech ostatních případech upřednostněným produktem 2,6-disubstituovaný pyrazin. Současně však vznikají různá množství 2,3- a 2,5-disubstituovaného derivátu. U 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů substituent s +M efektem (s výjimkou NH₂) potlačí atak atomu chloru na α -uhlík vzhledem k *N*-oxidovému seskupení a *para* k tomuto substituentu, vzniká tedy opět 2,6-disubstituovaný pyrazin. Jako vedlejší produkt

vzniká 2,3-disubstituovaný derivát vedle minoritního množství 2,5-izomeru. Substituent s -M efektem tento atak naopak usnadní, takže vedle 2,6-disubstituovaného pyrazinu vznikají jako vedlejší produkty 2,3-disubstituované deriváty s větším množstvím 2,5-izomerů než v předchozím případě. Upřednostnění vstupu atomu chloru na β -uhlík vzhledem k *N*-oxidové funkci je způsobeno -M efektem neoxidovaného atomu dusíku v pyrazinovém jádře, tento vliv je navíc posílen přítomností substituentu s -M efektem v jeho blízkosti. Vysoce selektivní syntézu chlorpyrazinů z 3-substituovaných derivátů pyrazinu-1-oxidu popsal v další své práci Sato¹⁹¹. Reakce 3-methoxy- nebo 3-chlorpyrazinu s chloridem fosforu v přítomnosti aminu (pyridin, diethylamin apod.) vedla k vysoce selektivní tvorbě 3-substituovaného 2-chlorpyrazinu, zatímco při použití chloracetylchloridu namísto chloridu fosforu byl získán 6-substituovaný 2-chlorpyrazin. Za podmínek bez použití aminu byl výchozí 3-methoxykarbonylpyrazin-1-oxid převeden na methylester 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (viz Tabulka 1).

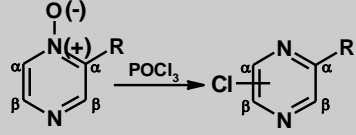
Chlorace 3-karboxypyrazin-1-oxidu probíhá za stejných podmínek jako chlorace 3-karbamoylpyrazin-1-oxidu. Abe¹⁹² prováděl tuto chloraci za nižší teploty a kratší dobu. Jako meziprodukt vzniká chlorid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny, který hydrolyzuje na 6-chlorpyrazin-2-karboxylovou kyselinu. V prostředí methanolu lze přímo získat methylester této kyseliny.

Tabulka 1: Reakce 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů s chloridem fosforylu (105°C, 2 h).

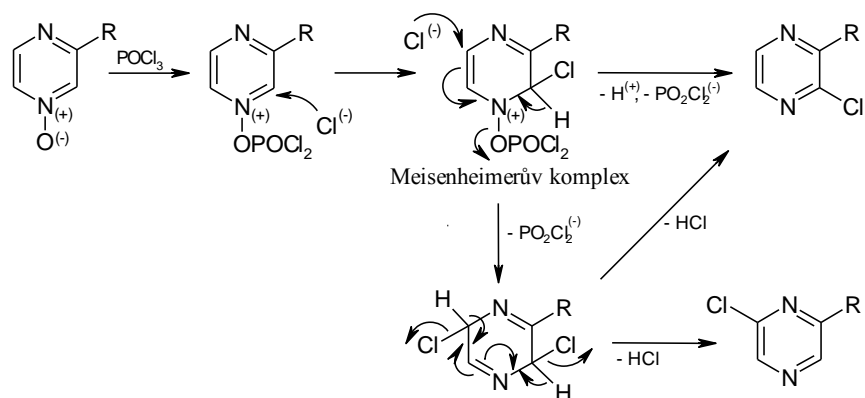
		Polohy atomu chloru a zastoupení izomerů ve směsi chlorderivátů [%]			
		α		β	
R	Výtěžek chlorace [%]	3	5	6	
NH ₂	51	99	1	-	
H ₃	OC	44	4	52	
	Cl	76	55	5	43
5	C ₆ H	96	43	8	49
	CO	88	22	22	56
NH ₂	CO	91	5	5	90
	OCH ₃	52	36	24	40

Chlorace 2-substituovaných pyrazin-1-oxidů s chloridem fosforylu vede opět ve vysokém výtěžku k 2,6-disubstituovanému pyrazinu, vedle minoritního 2,3-disubstituovaného produktu. Výtěžek 2,5-disubstituovaného pyrazinu je prakticky nulový, viz Tab 2.

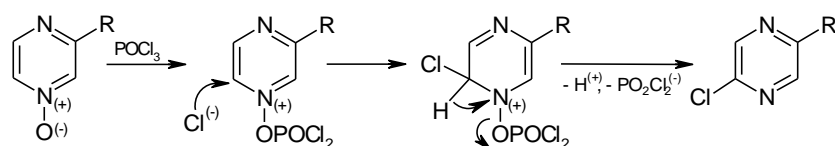
Tabulka 2: Reakce 2-substituovaných pyrazin-1-oxidů s chloridem fosforu (105°C, 2 h).

		Polohy atomu chloru a zastoupení izomerů ve směsi chlorderivátů [%]			
		β		α	
R	Výtěžek chlorace [%]	3	5	6	
H ₃	OC	61	12	0	88
	Cl	76	10	0	90
⁵	C ₆ H	72	11	2	87
	CO	89	1	0	99
	OCH ₃				
	CN	2	0	0	100

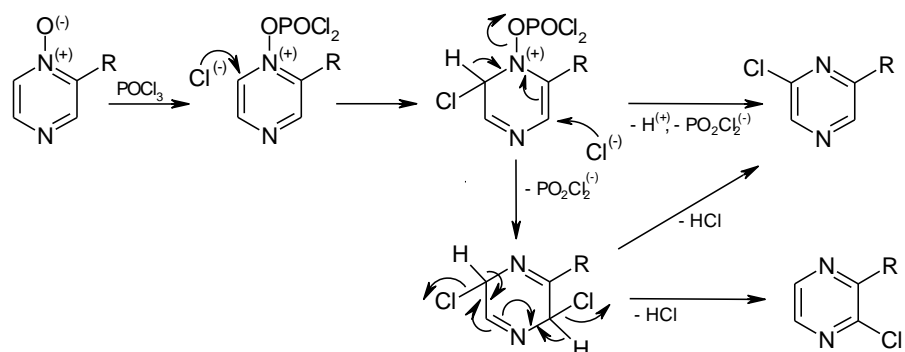
Níže je znázorněn pravděpodobný reakční mechanismus chlorace 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů s chloridem fosforu. Primárně vzniká ester dichlorofosfátu, který je nukleofilním atakem chloridového iontu na elektrondeficitní C₍₂₎ transformován na Meisenheimerův komplex. Ten může podléhat dvěma kompetitivním reakcím. Buď C₍₂₎ eliminuje proton a dichlorofosfátový anion za vzniku 2,3-disubstituovaného produktu, nebo dojde k sekundárnímu ataku C₍₅₎ chloridovým iontem a přes další reakční meziprodukt vzniká buď 2,3-disubstituovaný, resp. 2,6-disubstituovaný produkt.



Nukleofilním atakem chloridového iontu na elektrondeficitní C₍₆₎ 3-substituovaných pyrazin-1-esterů dichlorfosfátu pak vzniká 2,5-disubstituovaný produkt.



Reakční mechanismus chlorace 2-substituovaných pyrazin-1-oxidů s chloridem fosforu je obdobný; rovněž vzniká 2,6- resp. 2,3-disubstituovaný produkt.



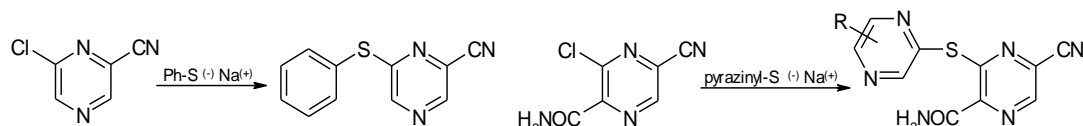
5.4.3.2.4 Substituční reakce chlorderivátů pyrazinu

Výměna halogenu za aminoskupinu, resp. za merkapto-, alkylthio- či arylthioskupinu arylhalogenidu vyžaduje obecně tvrdé reakční podmínky. Reakci značnou měrou usnadňuje přítomnost elektronegativních skupin (např.: NO₂, CN, CONH₂, COOH), zejména v polohách *ortho*

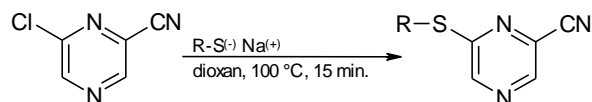
a *para*. Snadnost substituce halogenu vzrůstá dále s počtem těchto aktivizujících skupin¹⁹³.

Nukleofilní substituce typu alkylsulfanyl- či arylsulfanyldehalogenace

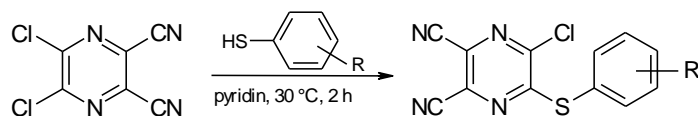
Pro syntézu alkylsulfanyl- či arylsulfanylpyrazinů se často využívá reakce halogenovaného derivátu pyrazinu s příslušným alkyl- či arylthiolátem. Reakce většinou vyžaduje dlouhodobé zahřívání, často v autoklávu. Takto připravil Asai z benzenthiolátu a 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu v prostředí ethanolátu sodného 6-(fenylsulfanyl)pyrazin-2-karbonitril. Koncem 80. let připravil pak Dlabal¹³⁹ zajímavé série na jádrech substituovaných symetrických a nesymetrických dipyrazinylsulfidů.



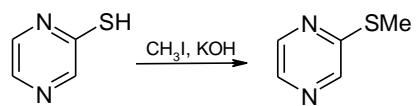
Foks¹⁹⁴ získal řadu alkylsulfanyl- a arylsulfanylderivátů pyrazin-2-karbonitrilu reakcí 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu s příslušným alkyl- resp. arylthiolátem sodným v prostředí dioxanu za normálního tlaku. Z těchto sloučenin pak syntetizoval celou řadu na jádre substituovaných funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny.



Portnoy¹⁹⁵ získal řadu potenciálních fungicid reakcí substituovaného benzenthiolátu s 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilem v prostředí pyridinu (akceptor uvolňujícího se chlorovodíku). Reakci lze možno provést i v triethylaminu (TEA) či jiné bázi.



Nutné je zmínit i možnost opačného postupu, tj. alkylace 2-sulfanylpyrazinů. Takovou metodu přípravy alkylsulfanylpyrazinů použil Cheeseman. 2-Sulfanylpyrazin protřepával s methyljodidem v prostředí hydroxidu draselného. Reakce proběhla za laboratorní teploty během devadesáti minut.



5.4.4 Příprava pyrazin-2-karboxylových kyselin a jejich funkčních derivátů

Zavedení PZA do terapie tuberkulózy podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazinkarboxylových kyselin, která tak představuje v chemii derivátů pyrazinu poměrně nejlépe prostudovanou skupinu.

5.4.4.1 Příprava karboxylových kyselin

Na jádře substituované pyrazin-2-karboxylované kyseliny lze připravit totální syntézou pyrazinového skeletu¹⁹⁶, oxidací chinoxalinu¹⁹⁷ manganistanem draselným, příp. oxidací alkylového řetězce na pyrazinovém kruhu¹⁹⁸. Mezi další postupy, kterými lze získat pyrazin-2-karboxylové kyseliny, patří zmýdelnění nitrilů, podle způsobu provedení získáme buď amidy nebo kyseliny¹⁹⁹⁻²⁰¹.

5.4.4.2 Příprava esterů

Pro přípravu esterů pyrazinkarboxylových kyselin se nejčastěji používají běžné esterifikační postupy, tj. reakce karboxylové skupiny s příslušným alkoholem za katalýzy kyseliny sírové či chlorovodíkové²⁰². Výhodné je odnímat vznikající vodu vhodným vysoušedlem.

5.4.4.3 Příprava chloridů kyselin

Chloridy pyrazinkarboxylových kyselin se nejčastěji připravují působením chloridu fosforečného²⁰³, případně účinkem chloridu thionylu²⁰⁴.

5.4.4.4 Příprava nitrilů

Pyrazinkarbonitrily lze získat, kromě totální syntézy pyrazinového cyklu, i klasickými metodami, např. zahříváním halogenovaných sloučenin s kyanidem měďným nebo dehydratací amidů.

Karmas a Spoerri připravili sérii různě substituovaných nitrilů působením kyanidu měďného na bromované pyraziny. Jako reakční prostředí použili buď pyridin, nebo γ -pikolin.

Nitrily vznikají také dehydratací amidů. Reakce byla provedena oxidem fosforečným v prostředí nitrobenzenu, suchého pyridinu nebo toluenu. Zatímco dehydratace 3-aminopyrazin-2-karboxamidu probíhala dobře (výtěžek 51%),

příprava pyrazin-2,5-dikarbonitrilu, který byl získán působením oxidu fosforečného na pyrazin-2,5-dikarboxamid v prostředí nitrobenzenu, probíhala s malým výtěžkem.

6-Chlorpyrazin-2-karbonitril vzniká při reakci 3-karbamoylpyrazin-1-oxidu s chloridem fosforu.

Moderním způsobem lze zavádět nitrilovou skupinu na pyrazinové jádro pomocí trimethylsilylkyanidu. Sato popsal reakci 3-substituovaných pyrazin-1-oxidů s trimethylsilylkyanidem v prostředí acetonitrilu, při které vznikají 3-substituované pyrazin-2-karbonitrily^{205, 206}.

6 Dosažené výsledky - komentář publikovaných výsledků

V této kapitole budou zmíněny výsledky, které byly opublikovány v recenzovaných časopisech. Jde o publikace, které vznikly s přispěním autora této práce. Autor se podílel na syntetické části těchto studií. Průběžné výsledky byly prezentovány formou plakátových sdělení na tuzemských i zahraničních konferencích (viz kapitola 7), sumarizovaná data pak byla publikována v odborných vědeckých časopisech. Kumulativní Impact Faktor (Thomson Reuters Citation report 2007) opublikovaných prací v časopisech činí 4,541. Dále byl na základě optimalizace syntetických postupů vyřešen grant FRVŠ s cílem zavést demonstraci moderních separačních metod používaných při syntéze analog pyrazinamidu do praktických předmětů Farmaceutická chemie a Technologie přírodních a syntetických léčiv oborů farmacie a zdravotnická bioanalytika¹⁴³.

6.1 Flash chromatografie

Postup přípravy derivátů pyrazinamidu v sobě zahrnuje reakce, vedoucí ke vzniku různých polohových izomerů (blíže viz kapitola 5.4.3.2). Už oxidace pyrazinamidu na příslušný *N*-oxid poskytuje tři izomerní sloučeniny. Podrobněji vzniklé *N*-oxidy chloraci použitím POCl₃, vzniká směs polohových izomerů, kterou je potřeba rozdělit. Vzhledem k tomu, že se jedná o polohové izomery, jejich R_f hodnota je velmi blízká. Jedinou možností separace vzniklých produktů z reakční směsi je použití sloupcové preparativní chromatografie.

Nejnáročnější separací bylo dělení clorpyrazinkarbonitrilů, kde se v chlorační směsi vyskytovaly 3 polohové izomery. Aplikována byla metoda krokové gradientové eluce soustavou ethyl-acetát : hexan ve vzrůstajícím poměru koncentrace ethyl-acetátu od 0 do 25 %, vždy v krocích po 2,5 %.

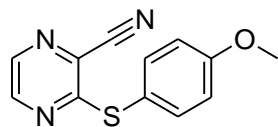
Velmi důležitým aspektem jakékoliv chromatografické metody je příprava chromatografické kolony. Firma Argonaut Technologies dodává k přístroji kolony vyrobené z plastu a předplněné silikagelem o velikosti částic 40-63 μm, což je obvyklá velikost částic silikagelu pro sloupcovou preparativní chromatografii. Alternativně lze využít sorbentu s menším průměrem částic, doporučeno je 20 – 40 μm, ale je potřeba počítat s tím, že eluce bude probíhat podstatně pomaleji díky

většímu odporu kolony. Předplněné kolony lze regenerovat, neboť jsou z obou stran uzavřeny plastovými fritami, které lze vyjmout a kolonu naplnit novým silikagelem. Při regeneraci kolony je nutno dbát na to, aby byla kolona naplněna rovnoměrně, nikde nevznikly žádné skuliny nebo vzduchové kapsy. Jde tedy o plnění kolony suchou metodou, metoda plnění využitím slurry se neosvědčila díky následné špatné těsnosti frity uzavírající tuto kolonu (vlhký silikagel u stěn).

Po naplnění suchým silikagelem je nutno aktivovat kolonu, což bylo vždy prováděno nejméně polární složkou eluční soustavy tak, že byla čerpána do kolony v recyklu po tak dlouhou dobu, dokud nepřestaly z vrchní části kolony unikat bublinky vzduchu. V tomto momentě je kolona řádně připravena pro nanesení vzorku. Vzorek lze nanášet buď v tekutém stavu (pokud je dostatečně tekutý) nebo nanesený na malé množství sorbentu (s výhodou silikagel v hmotnostním poměru 1 : 1 vůči nanášené směsi, nebo kysele promytý mořský písek ve stejném poměru. Kapalína se nanáší vždy na střed kolony a nechá se rozdifundovat do stran, písek se nanáší po celém průměru a zakryje se filtračním papírem, aby nedošlo ucpání kanálku pro přívod rozpouštědla v těsnícím pístu.

Nejvýhodnější postup eluce pro případ dikarbonitrilů je promytí 100 ml hexanu a následná kroková eluce se zvyšujícím se podílem ethylacetátu po 2,5 %, kdy každý krok tvoří 50 ml eluční směsi. Kolony byly plněny cca 50 g suchého silikagelu a děleno na nich bylo cca 2,5 g reakční směsi při průtoku cca 10 ml.min⁻¹. Tímto způsobem bylo tedy dosaženo poměru 20 : 1 sorbentu ku směsi, což je i dle literatury dobrý výsledek.

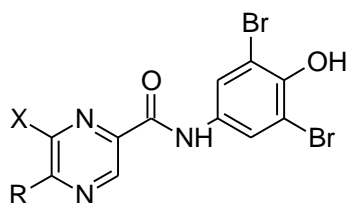
6.2 Příprava derivátů 3-chloropyrazin, 5-chloropyrazin nebo 6-chloropyrazinkarboxylových kyselin



MIC (*Trichophyton mentagrophytes*) = 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$

Deriváty odvozené od 3-chloropyrazin, 5-chloropyrazin nebo 6-chloropyrazin karboxylové kyseliny byly připraveny novou metodou regiosektivní syntézy analog pyrazinamidu, která byla vyvinuta na našem pracovišti. Součástí této metody přípravy je účinná chromatografická separace jednotlivých složek reakčních směsí, které vznikají během po sobě jdoucích syntetických kroků. Vzniklé chlorované deriváty pyrazin karboxylové kyseliny byly podrobeny nukleofilní substituční reakci s 4-methoxy nebo 3-methoxybenzenthioley v přítomnosti heterogenní mědi jako katalyzátoru. Byly tak získány 6-, 5- nebo 3-(4-methoxyfenyl)sulfanyl pyrazinkarbonitrily nebo příslušné karboxamidy a 6-, 5-, nebo 3-(3-methoxyfenyl)sulfanyl pyrazinakarbonitrily nebo příslušné karboxamidy. Tyto látky byly strukturně charakterizovány a podrobeny testování na antifungální aktivitu. Nejlepším se ukázal být 3-(4-methoxyfenyl)sulfanylpyrazin-2-karbonitril se slabou až střední antifungální aktivitou proti *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans*²⁰⁷.

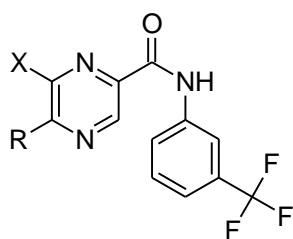
6.3 N-substituovaná analoga pyrazinamidu



Nejúspěšnější látky, R = H, *tert*-butyl, X = H, Cl

Kondenzačními reakcemi příslušných chloridů substituovaných pyrazinkarboxylových kyselin (pyrazinkarboxylové kyseliny, 6-chloropyrazinkarboxylové kyseliny 5-*tert*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny a 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazin-2-karboxylové kyseliny) s různými substituovanými

aminothiazoly nebo aniliny byla připravena série třiceti *N*-substituovaných pyrazin-2-karboxamidů. Nově připravené látky byly kompletně strukturně charakterizovány, byl jim chromatograficky stanoven Log P a následně byly otestovány na antituberkulotickou a antifungální aktivitu a inhibici fotosyntézy. Nejlepší antimykobakteriální aktivitu na kmenu *M. tuberculosis* H37Rv vykázaly amidy substituované 3,5-dibrom-4-hydroxyanilinem, kdy procento inhibice při koncentraci 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ činilo 54-72 %. Nejlepší antifungální aktivitu pak vykázal 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyrazin-2-karboxamid proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes*, kdy činila MIC 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Z pohledu inhibice generace kyslíku v chloroplastech špenátu (*Chlorella vulgaris*) dopadly nejlépe 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)-pyrazin-2-karboxamid a 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)-pyrazin-2-karboxamid s hodnotou IC_{50} 41,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respektive 49,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.¹³⁷.



Nejúspěšnější látky, R = H, *tert*-butyl, X = H, Cl

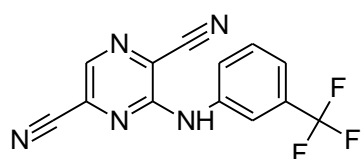
Syntéza *N*-substituovaných dvoujaderných analog pyrazinamidu pokračovala další sérií dvaceti látek odvozených od pyrazinamidu, 5-chlorpyrazin-2-karboxamidu, 5-*tert*-butylpyrazin-2-karboxamidu respektivně 5-chlor-6-*tert*-butylpyrazin-2-karboxamidu. V amidové části molekuly byly použity různě substituované aryly. Byla potvrzena struktura těchto látek, stanoven Log P a proveden biologický screening na antimykobakteriální a antifungální aktivitu a inhibici fotosyntézy v chloroplastech špenátu. Nejlepších biologických výsledků v případě antimykobakteriálního screeningu dosáhly *N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid s hodnotou 99 % inhibice růstu kolonií *M. tuberculosis* H37Rv při koncentraci 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 6-chlor-5-*tert*-butyl-*N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid s hodnotou 95 % inhibice při stejných podmínkách. Těmto látkám byla dále stanovena MIC s hodnotami 6,25 respektive 3,13 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. U těchto látek byla stanovena též IC_{50} s hodnotou 62,5

respektive 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledný index selektivity činí tedy 10, respektive 3,2, což posunulo první zmíněnou látku do dalších stádií biologického testování.

Z pohledu antifungální aktivity stojí za zmínku pouze střední aktivita 5-*tert*-butyl-*N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidu s hodnotou MIC 62,5 $\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ proti *Trichophyton mentagrophytes*.

Z pohledu inhibice generace kyslíku v chloroplastech špenátu (*Chlorella vulgaris*) dopadl nejlépe 6-chlor-*N*-(3-trifluoromethyl-fenyl)pyrazin-2-karboxamid s hodnotou IC_{50} 12,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$,¹³⁵.

6.4 Deriváty odvozené od pyrazin-2,5-dikarbonitrilu



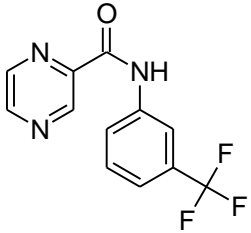
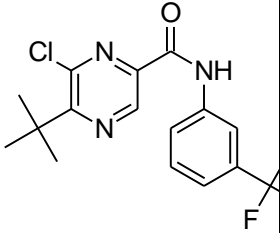
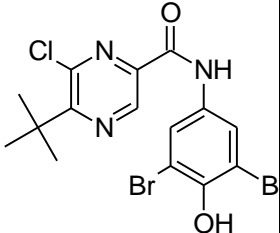
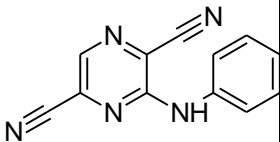
Nejúspěšnější látka, MIC = 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Nukleofilní substitucí 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitrilu různě substituovanými aniliny byla připravena série 3-arylamino-pyrazin-2,5-dikarbonitrilů. Připravené látky byly strukturně charakterizovány, byl jim chromatograficky stanoven $\log P$ a následně byly testovány na antimykobakteriální a antifungální aktivitu. Nejlepší antituberkulotickou aktivitu vykázal 3-[[3-(trifluormethyl)fenyl]amino]pyrazin-2,5-dikarbonitril s 94 % inhibice *M. tuberculosis* H37Rv při 6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Aktivita této látky byla nezávisle potvrzena dvěma pracovišti. Jedním z nich je TAACF při americké NIAID a druhým je oddělení mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Díky velmi dobré aktivitě se tato látka dostala do druhého kola screeningu TAACF, kde byla bohužel vyřazena díky velmi nízkému indexu selektivity, jinými slovy pro příliš vysokou cytotoxicitu. Relativně dobrou antifungální aktivitu s hodnotou MIC v rozmezí 3,91 – 31,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vykázaly látky 6-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitril a 3-(2-kyan-4-nitrofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril¹³⁸.

6.5 Diskuse dosažených výsledků z pohledu vztahu struktury a biologické aktivity

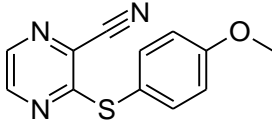
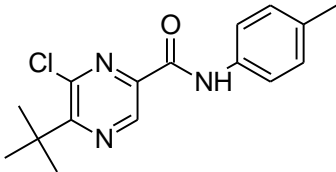
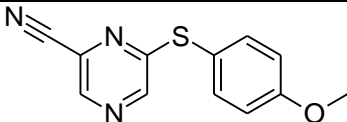
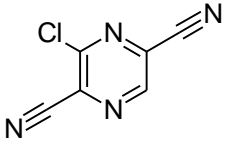
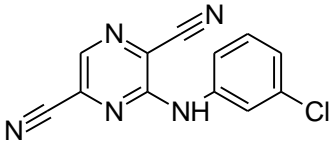
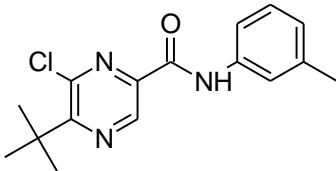
Ze všech uvedených látek by bylo možno dedukovat jisté zákonitosti pouze pro aktivitu antimykobakteriální, kde byly dosaženy velmi variabilní hodnoty biologické aktivity od téměř nulové až po celkem solidní, kdy se MIC blížila $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, což je dnes bráno jako hranice pro velmi dobrou aktivitu při výběru nových kandidátů na postup do vyšších fází preklinického testování.

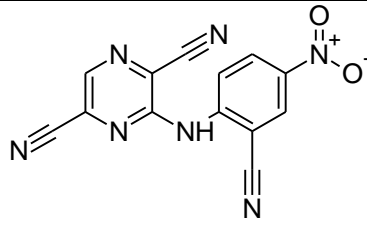
Tabulka 3: Antimykobakteriální aktivita, vybrané nejlepší látky

sloučenina	% inhibice	MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	I
	99	6,25	>62,5	10
	95	3,13	>10	3,2
	72	-	-	
	94	6,25	2,86	,45

Z pouhého pohledu na nejlepší struktury vyplývá, že dobrou aktivitu mají dvojjaderné deriváty nesoucí na druhém, většinou nepyrazinovém jádře elektronegativní substituent o velkém objemu a lipofilitě. Nejlépe pak velký halogenový atom jako je brom, nebo perfluorovaný methyl. Co se týče substituce na pyrazinovém jádře, zdá se, že může být variabilnější, aktivní jsou amidy i nitrily, i když u nitrilů dochází ke snížení indexu selektivity, kdežto u amidů je celkem dobrý. Další substituent kromě amidu nebo nitrilu na pyrazinovém jádře být může, aktivní jsou i látky s chlórem v poloze 6 nebo *tert*-butylem v poloze 5.

Tabulka 4: Antifungální aktivita, nejlepší látky. * - látky jsou aktivní i proti dalším patogenním houbám

sloučenina	MIC (Trichophyton mentagrophytes) 72 / 120 hod ($\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$)
	31,25 125
	31,25 31,25
	31,25 125
	15,62*
	15,62*
	31,25 62,5

	<p>31,25*</p>
---	---------------

Všechny připravené látky vykazovaly pouze střední antifungální aktivitu, kdy nejlépe dopadl derivát nesoucí největší počet nitrilových skupin.

Inhibice fotosyntézy nebyla zkoumána u všech derivátů, ale ze získaných dat vyplývá jistá korelace s antituberkulotickou aktivitou i podobnost aktivních struktur. Zdá se, že aktivní mohou být látky obsahující co nejvíce π -elektronových párů zapojených do konjugace a mající absorpční maximum posunuté co nejdále od fialové části spektra.

Do budoucna by bylo výhodné provést retrospektivní SAR analýzu všech na KFCHKL připravených derivátů za použití moderních výpočetních přístupů. Taková studie by mohla poskytnout strukturní typy pro optimalizační studii těch nejlepších látek, které byly dosud připraveny. Je možné, že takováto racionální studie relativně velké knihovny strukturně podobných látek povede buď k dalšímu zvýšení aktivity, nebo snížení toxicity nově připravených struktur. Obojí by mohlo být dobrým přínosem pro vývoj nových antituberkulotik na FaF UK.

7 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

Publikace:

Jampílek J., Doležal M., Palek L., Silva L., Buchta V.: Antifungal Properties of Some Arylsulfanylpirazine-2-carboxylic Acid Derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 33, 23-29 (2005). ISSN 1210-9495

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation. *Molecules* 11 (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ = 0.841

Palek L., Dvořák J., Svobodová M., Buchta V., Jampílek J., Doležal M.: Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie* 341 (1), 61-65 (2008). IF₂₀₀₇ = 1.300

Doležal M., Čmedlová P., Palek L., Vinšová J., Kuneš J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazinecarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (5), 1105-1113 (2008). ISSN: 0223-5234, IF₂₀₀₇ = 2.301

Elektronické konference:

Doležal M., Palek L., Roslerová Z., Kuneš J., Buchta V., Kráľová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides: Preparation and Biological Activity. Proceedings of ECSOC-8, The Eight International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, <http://www.mdpi.org/ecsoc-8.htm>, November 1-30, 2004, Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, ISBN 3-906980-15-4, Published in 2004 by MDPI, Basel, Switzerland, © 2004 by MDPI, Basel, Switzerland

Doležal M., Čmedlová P., Palek L., Kuneš J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazinecarboxamides. Proceedings of ECSOC-9, The Ninth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, C-020, <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/> November 1-30, 2005 Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, ISBN 3-906980-16-2, Published in 2005 by MDPI, Basel, Switzerland, © 2005 by MDPI, Basel, Switzerland

Palek L., Doležal M., Dvořák J., Buchta V., Čermák P., Medňanský M.: Substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles as new antiinfectives. Proceedings of ECSOC-9, The Ninth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, C-09, <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/> November 1-30, 2005 Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, ISBN 3-906980-16-2, Published in 2005 by MDPI, Basel, Switzerland, © 2005 by MDPI, Basel, Switzerland

Jampílek J., Palek L., Doležal M.: Synthesis and Hydrophobic Properties of Some Substituted 3-Arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles. Proceedings of ECSOC-10, The Tenth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/>, November 1-30, 2006 Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition ISBN 3-906980-18-9. Published in 2006 by MDPI, Basel, Switzerland © 2006 by MDPI, Basel, Switzerland

Přednášky:

Doležal M., Palek L.: Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik. Sborník IX. sjezdu České farmaceutické společnosti, Zlín – Academia Centrum UTB 13.-15. května 2004, str. 21. ISBN 80-900306-6-1

SVK na FaF UK, 2004

Palek L., Dvořák J., Doležal M.: Zavedení přípravy 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitrilu do praktických cvičení předmětů Farmaceutická chemie a Technologie syntetických léčiv oboru Farmacie na FaF UK v Hradci Králové. 58. sjezd chemických společností, Ústí n. L. září 2006, in Chem. Listy 100(8), 697 (2006). ISSN 0009-2770, IF₂₀₀₆=0.431

Postery:

Doležal M., Opačič N., Palek L., Kuneš J., Buchta V.: Syntéza a antifungální vlastnosti derivátů 3-aminopyrazin-2,5-dinitrilu. Sborník 55. sjezdu chemických společností, 8. až 12. září 2003, Košice, Slovensko, Chem. Listy 97 (9), 756 (2003). ISSN 0009-2770, IF₂₀₀₃ = 0.345

Palek L., Doležal M., Buchta V.: 3-Aminopyrazin-2,5-dinitrily jako potenciální antimykotika. Sborník IX. sjezdu České farmaceutické společnosti, Zlín – Academia Centrum UTB 13.-15. května 2004, str. 35. ISBN 80-900306-6-1

Doležal M., Palek, Buchta, Medňanský: Syntéza a biologické vlastnosti analogů pyrazinamidu. Sborník 33. konference „Syntéza a analýza léčiv“, 10. až 11. září 2004, Nitra, Slovenská republika. In: Farm. Obzor 53 (9-10), 237 (2004). ISSN 0014-8172

Palek L., Doležal M., Buchta V., Čermák P.: Synthesis and antiinfective evaluation of pyrazinamide analogues. Book of Abstracts of Jahrestagung - Joint

Meeting 2004, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Regensburg, October 6-9 2004, p. 121. ISBN 3-00-014723-3

Palek L., Doležal M., Buchta V., Čermák P.: Synthesis and antiinfective evaluation of pyrazinamide analogues. In Sborník 39. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. až 28. listopadu 2004, in *Chem. Listy*, 98 (11), 1027 (2004). ISSN 0009-2770, IF₂₀₀₃ = 0.345

Jampílek J., Doležal M., Palek L.: Radical arylation of pyrazine-2-carboxylic acid derivatives. Book of Abstracts: The 14th European Symposium on Organic Chemistry, Helsinki, Finland, July 4-8, 2005, p. 273. [ISBN 952-10-2553-0]

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Substituted amides of pyrazinoic acid, synthesis and biological evaluation. Book of Abstracts: The 14th European Symposium on Organic Chemistry, Helsinki, Finland, July 4-8, 2005, p. 350. [ISBN 952-10-2553-0]

Palek L., Doležal M., Buchta V., Medňanský M.: Structure-activity study on 3-arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitrile derivatives. Book of Abstracts: The 14th European Symposium on Organic Chemistry, Helsinki, Finland, July 4-8, 2005, p. 280. [ISBN 952-10-2553-0]

Palek L., Doležal M., Buchta V., Medňanský M.: Příprava a hodnocení analogů pyrazinamidu jako potenciálních antiinfektiv. In Sborník 40. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 18. až 20. listopadu 2005, in *Chem. Listy*, 99 (11), 863 (2005). ISSN 0009-2770, IF₂₀₀₃ = 0.345

Jampílek J., Doležal M., Palek L.: Preparation and Antimycobacterial Activity of Pyrazine-2-carboxylic Acid Thiazol-2-ylamide Derivatives. Book of Abstracts: The International Conference "Frontiers in Medicinal Chemistry", Frankfurt am Main, Germany, March 12-15, 2006, p. 90.

Palek L., Jampílek J., Doležal M.: RP-HPLC Assay and hydrophobic properties of novel pyrazinamide derivatives. Book of Abstracts: The International Conference "Drug Analysis 2006", Namur, Belgium, May 16-19, 2006, PK-28.

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Preparation, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazinecarboxylic acid. 19th International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC), Istanbul, Turkey, August 29-September 2, 2006, *Drugs Fut.* 2006, vol. 31, no. Suppl. A, 53, P6. [ISSN 0377-8282, IF₂₀₀₅ = 0.547]

Palek L., Doležal M., Buchta V., Čermák P.: New potential antimycobacterials and antifungals; structure-activity relationships in 3-arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles. 19th International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC), Istanbul, Turkey, August 29-September 2, 2006, *Drugs Fut.* 2006, vol. 31, no. Suppl. A, 58-59, P18. [ISSN 0377-8282, IF₂₀₀₅ = 0.547]

Jampílek J., Doležal M., Palek L., Vinšová J.: Structure-lipophilicity relationships in series of phenolic moiety ring-substituted pyrazinecarboxanilides. 19th International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC), Istanbul, Turkey, August 29-September 2, 2006, *Drugs Fut.* 2006, vol. 31, no. Suppl. A, 51, P1. [ISSN 0377-8282, IF₂₀₀₅ = 0.547]

Doležal M., Palek L., Svobodová M., Buchta V.: Synthesis, antifungal and antimycobacterial properties of pyrazinamide analogues. Joint Meeting of the Czech, German and Hungarian Pharmaceutical Societies, Marburg, Germany, October 4-7, 2006, Book of abstracts p. 124. ISBN 3-89703-685-1

Granty:

Palek L.: FRVŠ 2006 1412/G6: Inovace praktického cvičení: optimalizace syntézy a separace derivátů 2,5-pyrazindikarbonitrilu a hodnocení jejich biologické aktivity

8 Publikované práce

Jampílek J., Doležal M., Palek L., Silva L., Buchta V.: Antifungal Properties of Some Arylsulfanylpyrazine-2-carboxylic Acid Derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 33, 23-29 (2005). ISSN 1210-9495

ANTIFUNGAL PROPERTIES OF SOME ARYLSULFANYLPYRAZINE-2-CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES

JOSEF JAMPÍLEK¹, MARTIN DOLEŽAL^{2*}, LUKÁŠ PALEK², LUÍS SILVA³,
VLADIMÍR BUCHTA³

¹Zentiva a.s., U Kabelovny 130, 102 37 Prague, Czech Republic,

²Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, and

³Department of Biological and Medical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
e-mail: dolezalm@faf.cuni.cz

INTRODUCTION

Mycoses (fungal infections) are diseases caused by yeasts and moulds. There has been a dramatic increase in the incidence of fungal infections since 1980s and this fact has become importance problem in medicine. Fungi may be classified by the level of tissue affected as superficial, subcutaneous, and systemic. Mycoses of skin and their adnexa, including hair, nail and cornea are the most frequent forms of fungal diseases¹⁻³.

Relevant data regarding the incidence of systemic mycoses and their mortality are difficult to obtain. Many deaths due to mycoses are not reported because they are undiagnosed, misdiagnosed, or not specified because they are occurred secondary to a pre-existing condition. Nevertheless, several studies suggest that the incidence of fungal infections and attributed mortality are rising. This reflects the increasing number of predisposed hosts due to factors such as the human immunodeficiency virus (HIV) epidemic, advances in organ transplantation program and cancer chemotherapy, and the increasing use of invasive procedures for treatment, monitoring, and life support^{3,4}.

The occurrence of fungal infections is not uniform throughout the world. Most mycoses are caused by fungi with variable distribution. In addition, attack rates and incidence of opportunistic mycoses is associated with specific groups of patients at risk. *Candida* spp., followed by *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, and *Histoplasma* are accounted for the most of systemic infections.

Consistent with their role as opportunists, fungi have become important nosocomial pathogens. Most notable is the sharp rise in the rate of bloodstream infections with *Candida* and the increasing importance of uncommon fungal

pathogens such as *Candida non-albicans* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., and dermatiaceous fungi. The incidence of nosocomial candidemia is on rise. *Candida* had the highest attributable mortality rate, almost 40 %³.

Discovery of new drugs for systemic opportunistic fungal infections is a major challenge in antiinfection drug research. Established antifungal agents do not satisfy the medical need completely, azole derivatives are fungistatic and vulnerable to resistance, whereas polyenes and amphotericin B cause serious host toxicity. Modified azoles (voriconazol) and a new class of echinocandins (caspofungin) were introduced into clinical use. Other promising novel agents under preclinical study include several inhibitors of fungal protein, lipid and cell wall synthesis⁵.

Also some pyrazine derivatives showed in vitro antifungal activity. Dicyanochloropyrazines^{6,7} are patented as industrial preservatives and microbiocides. Some 5-halo-2-methylanilides of 2,3-dimethyl-5-(*N*-alkyl-carbamoyl)pyrazine-2-carboxylic acid⁸ were synthesized and tested for anticipated fungicidal activities, see Fig. 1.

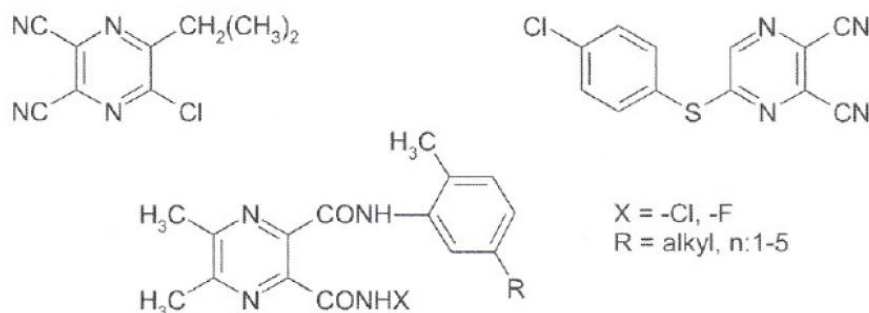


Figure 1. The antifungal active pyrazine derivatives⁶⁻⁸

This is a follow-up paper to the previous studies⁹⁻¹², where the structure antifungal activity relationships among pyrazine-2-carboxylic acid derivatives were discussed. Our work aimed at presenting the antifungal activity of the phenylsulfanylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives **1-13**, studying structure-activity relationships in this series, and to compare their activities with calculated log *P* values.

EXPERIMENTAL

Chemicals

The studied compounds are shown in Fig. 2 and listed in Table 1. Synthesis, physico-chemical data and analytical parameters of the discussed pyrazine-2-carboxylic acid derivatives were described elsewhere^{13,14}.

In vitro antifungal susceptibility testing

The broth microdilution test^{15,16} was used for the assessment of *in vitro* antifungal activity of the synthesized compounds against *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigelii* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC), and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM) in comparison with fluconazole (FLU). The procedure was performed with twofold dilution of the compounds in RPMI 1640 (Sevapharma) buffered to pH 7.0 with 0.165 mol of 3-morpholino-propane-1-sulfonic acid. The final concentrations of the compounds ranged from 500 to 0.975 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Drug-free controls were included. The MICs were determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C. With *Trichophyton mentagrophytes*, the final MICs were determined after 72 and 120 h of incubation. The results are summarized in Table 2.

Lipophilicity calculations

Hydrophobicity of compounds (log *P* values) was computed using the program CS ChemOffice Ultra ver. 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge MA, USA). Results are shown in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

Three regioisomers of 6-chloropyrazine- or 5-chloropyrazine- or 3-chloropyrazine-2-carboxylic acid derivatives were coupled with 4- or 3-methoxybenzene-1-thiols under catalysis by powdered copper oxide. This nucleophilic substitution provided a series of 6- or 5- or 3-(4-methoxyphenyl)- and 6- or 5- or 3-(3-methoxyphenyl)sulfanylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives¹⁴, which were tested for their antifungal activity. The results of this biological evaluation allow us to conclude some structure-activity relationships (SAR) in the series of the methoxyphenylsulfanylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives¹³, see Fig. 2 and Table 1.

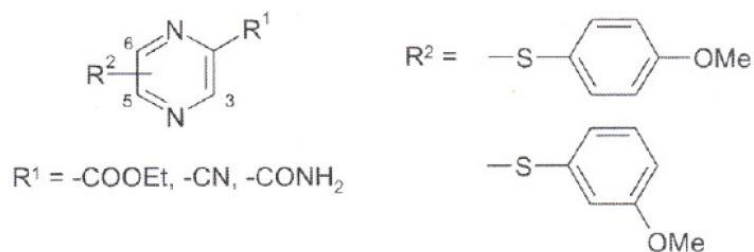


Figure 2. General structure of methoxyphenylsulfanylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives

Jampilek J., Doležal M., Palek L., Silva L., Buchta V.: Antifungal Properties of Some Arylsulfanylpyrazine-2-carboxylic Acid Derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 33, 23-29 (2005). ISSN 1210-9495

Table 1. Structure and calculated lipophilicity (log *P*) in the series of studied compounds 1–13 in comparison with the standard fluconazole (FLU)

Compounds	R ¹	R ²	log <i>P</i>
1	COOC ₂ H ₅	6-(4-MeOPhS)	2.63
2	CN	6-(4-MeOPhS)	2.51
3	CONH ₂	6-(4-MeOPhS)	1.38
4	CN	6-(3-MeOPhS)	2.51
5	CONH ₂	6-(3-MeOPhS)	1.38
6	CN	5-(4-MeOPhS)	2.51
7	CONH ₂	5-(4-MeOPhS)	1.38
8	CN	5-(3-MeOPhS)	2.51
9	CONH ₂	5-(3-MeOPhS)	1.38
10	CN	3-(4-MeOPhS)	2.51
11	CONH ₂	3-(4-MeOPhS)	1.38
12	CN	3-(3-MeOPhS)	2.51
13	CONH ₂	3-(3-MeOPhS)	1.38
FLU			0.99

Antifungal activity

The antifungal activity of these 13 compounds was investigated *in vitro* against *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera*, and *Trichophyton mentagrophytes* by the broth microdilution method. The results are shown in Table 2. Several compounds showed only moderate antifungal activities especially against *Trichophyton mentagrophytes* and *Candida albicans*. Their MIC values ranged from 31.25 to 500 μmol · dm⁻³.

Table 2. Antifungal activity in the series of studied compounds 1–13 in comparison with the standard fluconazole (FLU) expressed as MIC (μmol · dm⁻³)

Compounds	MIC/EC ₈₀ (μmol · dm ⁻³)							
	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
1	62.5	500	500	500	500	250	500	125
	250	> 500	> 500	> 500	> 500	500	> 500	250
2	31.25	125	125	125	125	62.5	250	31.25
	125	250	250	250	500	250	500	62.5
3	125	250	250	250	500	125	250	125
	250	500	500	500	(500)	250	500	250
4	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	125
	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	> 125	125

Compounds	MIC/EC ₈₀ (μmol · dm ⁻³)							
	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM
	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	24 h 48 h	72 h 120 h
5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	250
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	500
6	62.5	500	500	500	250	125	250	62.5
	250	>500	500	>500	250	125	500	125
7	250	>500	>500	>500	500	250	>500	125
	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250
8	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9	125	>500	>500	>500	500	250	>500	250
	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500
10	31.25	250	125	125	125	62.5	250	62.5
	125	500	250	250	500	>500	>500	62.5
11	125	500	250	250	500	125	>250	125
	250	>500	500	500	>500	250	>500	250
12	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
13	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
FLU	0.06	0.12	3.91	0.98	0.24	>125	>125	1.95
	0.12	>125	15.62	3.91	0.48	>125	>125	3.91
Tested strains								
CA – <i>Candida albicans</i> ATCC 44859				TB – <i>Trichosporon beigelii</i> 1188				
CT – <i>Candida tropicalis</i> 156				TM – <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445				
CK – <i>Candida krusei</i> E28				AF – <i>Aspergillus fumigatus</i> 231				
CG – <i>Candida glabrata</i> 20/I				AC – <i>Absidia corymbifera</i> 272				

The methoxy group position is very important for antifungal activity. The methoxy moiety in C₍₃₎ of the benzene ring caused compounds solubility loss in the testing medium, therefore all derivatives with the methoxy group in C₍₃₎ showed lower activities in comparison with the compounds substituted by the methoxy moiety in C₍₄₎.

Substitution by methoxyphenylsulfanyl moiety of position C₍₆₎ or C₍₅₎ or C₍₃₎ of pyrazine nucleus showed further influence on the biological activity. The compounds substituted in C₍₆₎ seem to be most advantageous.

The variety of the C₍₂₎ substitution of pyrazine nucleus proved to be important as well. A carbonitrile moiety showed higher activity than the amide group, which

Jampílek J., Doležal M., Palek L., Silva L., Buchta V.: Antifungal Properties of Some Arylsulfanylpyrazine-2-carboxylic Acid Derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 33, 23-29 (2005). ISSN 1210-9495

we expected, nevertheless the presence of the ester moiety ensured an interesting activity of compound **1**. This fact is probably the consequence of the advantageous substitution of pyrazine C₍₆₎ position and benzene C₍₄₎ position.

Additionally the values of hydrophobicity in the series of the studied compounds were computed. The range of compounds log *P* was between 1.38 and 2.63. Their activity increased with higher lipophilicity; nitriles (log *P* = 2.51) and ester (log *P* = 2.63). See Table 1 for the results.

In summary, the most efficient compounds in the series of the substituted pyrazine-2-carboxylic acid derivatives were 6-[(4-methoxyphenyl)sulfanyl]pyrazine-2-carbonitrile (**2**) and 3-[(4-methoxyphenyl)sulfanyl]pyrazine-2-carbonitrile (**10**), log *P* = 2.51.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by IGA Ministry of Health of the Czech Republic No. IA8238-3.

REFERENCES

1. POLAK, A.: *Mycoses*, 42, 1999, 355.
2. FOSTEL, J. M., LARTEY, P. A.: *Drug Discovery Today*, 5, 2000, 25.
3. Merck & Co. web site: <http://www.merckmedicus.com/pp/us/hcp/diseasemodules/fungal/> (3 December 2004).
4. REES, J. R., PINNER, R. W., HAJJEH, R. A.: *Clin. Infect. Dis.*, 27, 1998, 1138.
5. DOLEŽAL, M.: *Čes. slov. Farm.*, 51, 2002, 226.
6. Kyowa Gas Chemical Industry Co., Ltd. JP 80,164, 606 (1980).
7. Kyowa Gas Chemical Industry Co., Ltd. JP 80,164, 607 (1980).
8. TSUDA, T., KOBAYASHI, K., ICHIMOTO, I.: *Nippon Noyaku Gakkaishi*, 22, 1997, 218.
9. DOLEŽAL, M., HARTL, J., BUCHTA, V.: *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 26, 2001, 7.
10. KRINKOVÁ, J., DOLEŽAL, M., HARTL, J., BUCHTA, V.: *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 26, 2001, 21.
11. KRINKOVÁ, J., DOLEŽAL, M., HARTL, J., BUCHTA, V., POUR, M.: *Il Farmaco*, 57, 2002, 71.
12. DOLEŽAL, M., JAMPÍLEK, J., OSIČKA, Z., KUNEŠ, J., BUCHTA, V., VÍCHOVÁ, P.: *Il Farmaco*, 58, 2003, 1105.
13. JAMPÍLEK, J.: Ph.D. Thesis. Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Hradec Králové 2004.
14. JAMPÍLEK, J., DOLEŽAL, M., KUNEŠ, J., ŠATÍNSKÝ, D., RAICH, I.: *Curr. Org. Chem.*, 9, 2005, 49.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Proposed Standard M 27-P, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa 1992.
16. SHEEHAN, D. J., ESPINEL-INGROFF, A., STEELE, M., WEBB, C. D.: *Clin. Infect. Dis.*, 17, 1993, 494.

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation. *Molecules* 11 (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ = 0.841

Molecules 2006, 11, 242-256

molecules

ISSN 1420-3049
<http://www.mdpi.org>

Full Paper

Substituted Pyrazinecarboxamides: Synthesis and Biological Evaluation[†]

Martin Dolezal^{1,*}, Lukas Palek¹, Jarmila Vinsova¹, Vladimir Buchta¹, Josef Jampílek² and Katarina Kralova³

¹ Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

² Zentiva, a.s. U Kabelovny 130, 102 37 Prague 10, Czech Republic

³ Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska Dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

[†] Preliminary results were presented at the Seventh Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-7, <http://www.mdpi.net/ecsoc-7>), November 1-30, 2003 (paper C001).

* Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: martin.dolezal@faf.cuni.cz; Tel.: (+420) 49-5067272; Fax: (+420) 49-5512423.

Received: 20 July 2005; in revised form: 19 March 2006 / Accepted: 20 March 2006 / Published: 29 March 2006

Abstract: Condensation of the corresponding chlorides of some substituted pyrazine-2-carboxylic acids (pyrazine-2-carboxylic acid, 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid, 5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic acid or 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid) with various ring-substituted aminothiazoles or anilines yielded a series of amides. The syntheses, analytical and spectroscopic data of thirty newly prepared compounds are presented. Structure-activity relationships between the chemical structures and the antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of the evaluated compounds are discussed. 3,5-Bromo-4-hydroxyphenyl derivatives of substituted pyrazinecarboxylic acid, **16-18**, have shown the highest activity against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (54-72% inhibition). The highest antifungal effect against *Trichophyton mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain tested, was found for 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**8**, MIC = 31.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$). The most active inhibitors of oxygen evolution rate in spinach

chloroplasts were the compounds 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)-pyrazine-2-carboxamide (**27**, IC₅₀ = 41.9 μmol·L⁻¹) and 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(1,3-thiazol-2-yl)-pyrazine-2-carboxamide (**4**, IC₅₀ = 49.5 μmol·L⁻¹).

Keywords: Pyrazinecarboxamides; *in vitro* antimycobacterial, antifungal and photosynthesis inhibition activity; lipophilicity determination.

Introduction

One third of the world's population is infected with tuberculosis (TB), therefore today TB still represents one of the major worldwide public health problems. The current recommended strategy is facing two problems: multidrug resistance and HIV/AIDS pandemic [1]. There is an urgent need for new antimycobacterial drugs, especially for treatment of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB), a growing problem among HIV-infected patients [2]. Additionally, in patients with impaired cellular immunity, mycobacterial and fungal (*Aspergillus*, *Histoplasma*, etc.) infections predominate and may coexist [3]. Pyrazinamide (PZA) is an important sterilising tuberculosis drug that helps to shorten the duration of current chemotherapy regimens for tuberculosis. PZA enters *Mycobacterium tuberculosis* by passive diffusion, is converted to pyrazinoic acid by nicotinamidase (pyrazinamidase) and is then excreted by a weak efflux pump [4].

In connection with our research into antimycobacterial pyrazine derivatives [5] we were interested in binuclear analogues containing -CONH- bridges [6-9]. Various compounds possessing -CONH- groups were found to inhibit photosynthetic electron transport [10-13]. Amides of 2-alkylpyridine-4-carboxylic acid and 2-alkylsulfanylpyridine-4-carboxylic acid inhibited oxygen evolution rates in *Chlorella vulgaris* and their inhibitory activity depended on the lipophilicity of the compounds [6,7]. This paper is the continuation of our studies of antimycobacterial active pyrazinecarboxylic acid derivatives, especially binuclear compounds connected by -CONH- bridges [5]. Previous studies [7-9,14] showed that alkylation, amidation, arylation of the pyrazine ring or substitution of the pyrazine with chlorine increased antituberculous and/or antifungal activity in series of functional pyrazinecarboxylic acid derivatives. We have recently reported the synthesis of a series of amides prepared from the substituted pyrazinecarboxylic acids and some aminophenols, halogenated and alkylated anilines. All these amides possess some antimycobacterial, antifungal and antialgal properties [7-9,15].

The present study is concerned with the synthesis of the series of heterocyclic amides prepared from substituted pyrazine-2-carboxylic acids and 2-aminothiazole, 2-amino-4-methyl- or 2-amino-5-methylthiazole, and 2-bromoaniline, 2,6-dibromo-4-aminophenol, 3-methoxyaniline, 3,5-dimethoxyaniline, 5-bromo-2-hydroxyaniline or 3,4-dichloroaniline, respectively. One of the derivatives synthesized, the *N*-thiazol-2-yl amide of pyrazine-2-carboxylic acid (**1**) was originally prepared by Kushner and its antimycobacterial activity was tested, too [16].

One of the major goals for the physico-chemical characterisation of drugs is the prediction and/or measurement of their lipophilicity. The logarithm of the octanol-water partition coefficient (log *P*) has become the most widely used parameter for defining lipophilicity and various *in silico* calculation software packages have made possible the use of log *P* values in predictive models for absorption, distribution, excretion and metabolism properties of drugs [17,18]. Reversed phase high-performance

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
 Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
 Molecules 11 (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
 0.841

Molecules 2006, 11

244

liquid chromatography (RP-HPLC) provides an easy, reliable and accurate way to determine the concentration of a compound in solvents used for the measurement of partition coefficients. The chromatographic retention time directly relates to the compound's distribution between the mobile and the stationary phases. The retention factor (K) determined from the retention time (T_R) and death time (T_D) as $(T_R - T_D)$ is equal to the *ratio* of the average number of analyte molecules in the stationary phase to the average number of molecules in the mobile phase (cf. Eq. 1) during the elution process. $\log K$, calculated from the capacity factor K , is used as the lipophilicity index converted to $\log P$ scale [19].

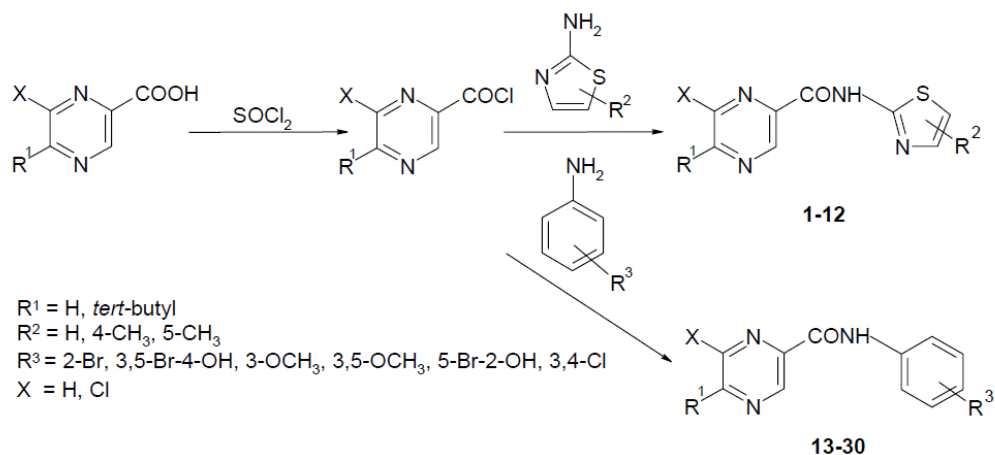
$$K = \frac{T_R - T_D}{T_D} \quad (\text{Eq. 1})$$

The aim of this work was to establish the structure-activity relationships in the mentioned series, *i.e.* to continue in studying of the substituent variability influence on the biological effect, and to determine the importance of increased hydrophobic properties for antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of newly prepared substituted pyrazinecarboxamides.

Results and Discussion

The synthesis of amides is shown in Scheme 1. Condensation of chlorides of pyrazine-2-carboxylic acid [20], 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid [21], 5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic acid [7] or 6-chloro-5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic [7] acid with 2-aminothiazoles and ring-substituted anilines yielded a series of amides of mentioned pyrazine-2-carboxylic acids **1-30**. The melting points, yields, elemental analyses, IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectral data for the all compounds prepared are given in the Experimental. Calculated $\log P$ values and measured $\log K$ values of all derivatives studied are shown in Table 1.

Scheme 1: Synthesis of some substituted pyrazine-2-carboxamides **1-30**.



All compounds prepared were evaluated for their *in vitro* antimycobacterial activity. Both the highest activity (72% inhibition) against *M. tuberculosis* and the highest lipophilicity ($\log P = 6.00$) of

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
 Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules *11* (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
 0.841

Molecules **2006**, *11*

245

all compounds studied was found for 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-pyrazine-2-carboxamide (**18**). Two other compounds, **16**, **17**, with the identical substitution on the aromatic part of the molecule, exert a comparable activity. The majority of compounds exhibited only modest antimycobacterial activity (see Table 1 and Figure 1). In the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF) program compounds effecting <90% inhibition in this primary screen (*i.e.* MIC > 6.25 mg mL⁻¹) are generally not evaluated further [22]. On the other hand, such “inactive” compounds may still have significant inhibitory activity and this data should not be ignored; analogues, derivatives, and alterations in physical properties may confer some positive changes in biological effects. Therefore synthesis and evaluation of other pyrazinecarboxylic acid derivatives is necessary to round out the structure-activity data.

Table 1: Calculated lipophilicity (log *P*), logarithm of capacity factors (log *K*), antimycobacterial evaluation (% of inhibition), antifungal susceptibility (MIC) and OER inhibition in spinach chloroplasts (IC₅₀) of compounds **1-30** in comparison with standards: pyrazinamide (PZA), fluconazole and atrazine.

Compound	X	R ¹	R ² / R ³	log <i>P</i>	log <i>K</i>	% Inhibition at 6.25 μg mL ⁻¹	MIC ^b (μmol mL ⁻¹)	IC ₅₀ (μmol.L ⁻¹)
1	H	H	H	0.31	0.5565	0	>500/>500	<i>b</i>
2	Cl	H	H	1.21	0.6064	32	>500/>500	1589.0
3	H	(CH ₃) ₃ C	H	2.44	0.8987	47	125/125	<i>b</i>
4	Cl	(CH ₃) ₃ C	H	3.34	1.2282	42	125/125	49.5
5	H	H	4-CH ₃	1.01	0.6112	0	>500/>500	582.8
6	Cl	H	4-CH ₃	1.91	0.7068	21	250/500	485.5
7	H	(CH ₃) ₃ C	4-CH ₃	3.14	1.0446	35	125/250	180.6
8	Cl	(CH ₃) ₃ C	4-CH ₃	4.04	1.4174	52	31.25/31.25	88.8
9	H	H	5-CH ₃	0.65	0.6193	10	1000/1000	862.2
10	Cl	H	5-CH ₃	1.55	0.7213	15	125/250	453.7
11	H	(CH ₃) ₃ C	5-CH ₃	2.77	1.0670	65	125/125	311.4
12	Cl	(CH ₃) ₃ C	5-CH ₃	3.67	1.4425	61	31.25/62.5	219.0
13	Cl	H	2-Br	2.94	1.0014	28	>500/>500	333.8
14	H	(CH ₃) ₃ C	2-Br	3.51	1.4057	22	500/500	170.7
15	Cl	(CH ₃) ₃ C	2-Br	4.63	1.6873	25	250/250	315.4
16	Cl	H	3,5-Br-4-OH	4.31	1.0450	69	>500/>500	995.2
17	H	(CH ₃) ₃ C	3,5-Br-4-OH	4.88	1.3158	54	>500/>500	404.3
18	Cl	(CH ₃) ₃ C	3,5-Br-4-OH	6.00	1.8895	72	125/125	590.3
19	Cl	H	3-OCH ₃	2.42	0.6671	2	>500/>500	499.8
20	H	(CH ₃) ₃ C	3-OCH ₃	2.98	0.9146	53	>500/>500	799.5
21	Cl	(CH ₃) ₃ C	3-OCH ₃	4.10	1.1148	23	250/250	644.0
22	Cl	H	3,5-OCH ₃	2.46	0.7701	11	1000/1000	533.0
23	H	(CH ₃) ₃ C	3,5-OCH ₃	3.02	1.0286	5	500/500	317.2

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
 Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
 Molecules 11 (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
 0.841

Molecules 2006, 11

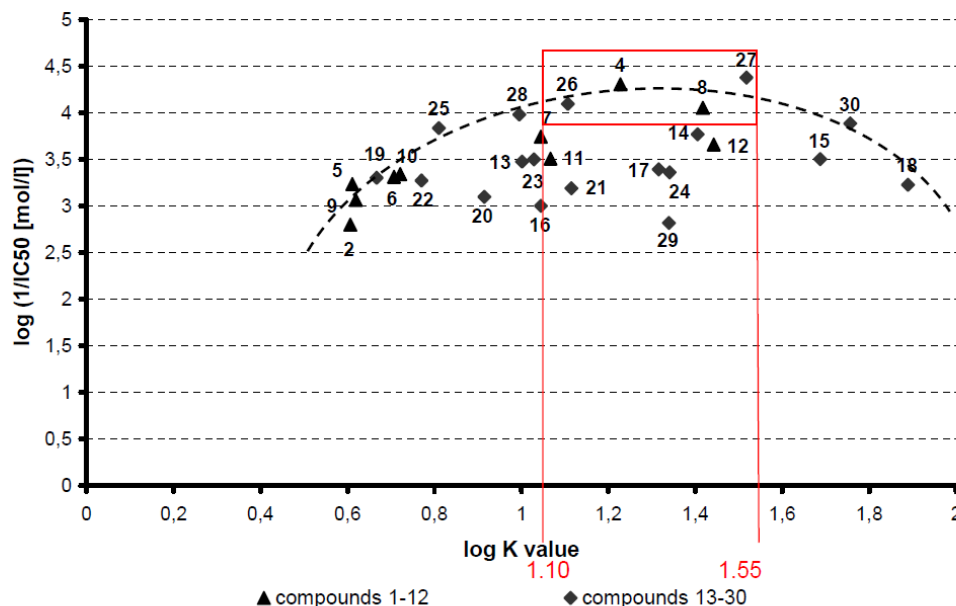
246

Table 1. Cont.

24	Cl	(CH ₃) ₃ C	3,5-OCH ₃	4.14	1.3407	0	125/250	435.1
25	Cl	H	5-Br-2-OH	3.34	0.8105	0	>500/>500	146.2
26	H	(CH ₃) ₃ C	5-Br-2-OH	3.91	1.1070	0	>500/>500	80.3
27	Cl	(CH ₃) ₃ C	5-Br-2-OH	5.03	1.5181	30	125/125	41.9
28	Cl	H	3,4-Cl	4.15	0.9950	61	125/250	104.8
29	H	(CH ₃) ₃ C	3,4-Cl	4.72	1.3395	15	125/125	1525.1
30	Cl	(CH ₃) ₃ C	3,4-Cl	5.84	1.7563	0	62.5/62.5	130.1
PZA	-	-	-	0.37	-	100 ^a	-	-
fluconazole	-	-	-	0.99	-	-	1.95/3.91	-
atrazine	-	-	-	1.03	-	-	-	1.0

^aMIC = 12.5 µg mL⁻¹, data from [27]; ^bagainst *T. mentagrophytes* after 72 h / 120 h; ^cnot tested due to their low solubility in DMSO.

Figure 1: Quasi-parabolic dependence between logarithm of retention factor (log *K*) and photosynthesis-inhibiting activity {log (1/IC₅₀ [mol/L])} of studied compounds 1-30.



The evaluation of *in vitro* antifungal activity of the synthesized compounds was performed against eight fungal strains. The results revealed no interesting activity against the majority of strains tested. Only the compounds 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**12**) and especially 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**8**) showed some promising *in vitro* antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain evaluated, (MIC = 31.25 – 62.5 µmol·mL⁻¹), although this activity is only modest in

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

247

comparison with fluconazole, the standard (MIC = 3.91 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ after 120 h, see Table 1). The negative antifungal screening results do not allow us to draw detailed conclusions on potential structure–activity relationships. On the other hand, the influence of an increasing lipophilicity parameter on the increasing *in vitro* antifungal activity in the series of compounds evaluated is remarkable.

The majority of the thirty compounds studied inhibited photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts (see Table 1 and Figure 1; compounds **1** and **3** were not tested for their photosynthesis-inhibition activity due to their low solubility in DMSO). The IC₅₀ values varied in the range 41.9 to 1589 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The inhibitory activity of the studied compounds was relatively low, the most efficient inhibitors were compounds **8** (IC₅₀ = 88.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), **4** (IC₅₀ = 49.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and mainly 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-bromo-2-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**27**, IC₅₀ = 41.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). For the series of compounds **5-8** and **9-12** the biological activity showed a linear increase with increasing lipophilicity of the compounds within these series. In both series of anilides **13-15** and **16-18**, in the case of the lipophilic compounds **15** (log *P* = 4.63) and/or **18** (log *P* = 5.28) a significant activity decrease was observed. Results from previous observations have exposed the importance of the phenolic moiety for the photosynthesis-inhibiting activity in the previously studied series of substituted pyrazine-2-carboxamides [7, 8]. However, the biological activity of compounds **16-18** was lower than that of compounds **13-15**. We assume that this activity decrease was connected with the increased lipophilicity of the compounds due to the presence of two bromine atoms.

Hydrophobicity parameters (log *P* values) of compounds **1-30** were calculated and measured by means of RP-HPLC determination of capacity factor *K* and subsequently calculated log *K*. The values of calculated lipophilicity (log *P*) of compounds ranged from 0.31 to 6.00. It can be assumed that the computed log *P* values and the calculated log *K* values correspond relatively with expected lipophilicity increases within individual series of compounds (pyrazine < 6-chloropyrazine < 5-*tert*-butylpyrazine < 6-chloro-5-*tert*-butylpyrazine). Capacity factor *K*/calculated log *K* values specify lipophilicity within individual series of compounds. Results are shown in Table 1.

The lower antimycobacterial activities of the compounds presented do not allow us to draw final conclusions on structure–activity relationships (SAR). Better SAR results are expressed in Figure 1, where the quasi-parabolic dependence between the logarithm of the retention factors (log *K*) and photosynthesis-inhibiting activity {log (1/IC₅₀ [mol/L])} of all studied compounds is shown. Lipophilicity expressed as log *K* values ranged from 1.10 to 1.55.

From the point of view of the chemical structure, all compounds can be divided into two groups: (*i*) compounds with an aminothiazole moiety (**1-12**, triangles in Figure 1) and (*ii*) compounds with an aniline moiety (**13-30**, lozenges in Figure 1). The optimal substitution for the first group of compounds was found to be the methyl group on C₍₅₎ of the thiazole ring. The optimal substitution in the second group was found, in agreement with our previous results [7], to be the phenol and halogen (bromine) moieties. The compound 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)pyrazine-2-carboxamide (**8**) was identified as the most active one in the three different biological assays. However, there is no general trend in the SAR of the compounds evaluated.

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation. *Molecules* 11 (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ = 0.841

Molecules 2006, 11

249

Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.). The calculated log *K* values of all compounds are shown in Table 1.

Synthesis of amides **2a-r**

A mixture of acid, *i.e.* pyrazine-2-carboxylic [20], 6-chloropyrazine-2-carboxylic [21], 5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic [7] or 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic [7] acids, respectively, (50.0 mmol) and thionyl chloride (5.5 mL, 75.0 mmol) was refluxed in dry toluene (20 mL) for about 1 h. Excess thionyl chloride was removed by repeated evaporation *in vacuo* with fresh dry toluene. The crude acyl chloride dissolved in dry acetone (50 mL) was added dropwise to a stirred solution of the corresponding substituted amine (50.0 mmol) in dry pyridine (50 mL) kept at room temperature. After the addition was complete, stirring continued for another 30 min. The reaction mixture was then poured into cold water (100 mL) and the crude amide was collected and recrystallized from aqueous ethanol.

Pyrazine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide (1). Yield: 88%; m.p. 187-188 °C (Ref. [16]; m.p. 187-189 °C); For C₈H₆N₄OS (206.2) calculated: 46.59% C, 2.93% H, 27.17% N; found: 46.55% C, 2.91% H, 26.98% N; *R*_F = 0.43; IR cm⁻¹: 3432 (N-H), 1668 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 11.14 (bs, 1H, NH), 9.52 (d, 1H, *J*=1.79 Hz, H3), 8.86 (d, 1H, *J*=1.79 Hz, H6), 8.65-8.63 (m, 1H, H5), 7.55 (d, 1H, *J*=3.57 Hz, H4'), and 7.09 (d, 1H, *J*=3.57 Hz, H5'); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 160.7, 157.3, 148.3, 144.9, 143.0, 142.7, 138.2, and 114.3.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide (2). Yield: 98%; m.p. 153-155 °C; For C₈H₅ClN₄OS (240.7) calculated: 39.92% C, 2.09% H, 23.28% N; found: 40.03% C, 1.92% H, 23.33% N; *R*_F = 0.65; IR cm⁻¹: 3435 (N-H), 1675 (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 10.91 (bs, 1H, NH), 9.17 (s, 1H, H3), 7.59 (d, 1H, *J*=3.57 Hz, H4'), 7.36 (d, 1H, *J*=3.57 Hz, H5'), and 1.50 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 163.6, 161.5, 158.2, 145.8, 141.7, 140.9, 137.7, 114.8, 38.8, and 28.2.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide (3). Yield: 45%; m.p. 131-132 °C; For C₁₂H₁₄N₄OS (262.3) calculated: 54.94% C, 5.38% H, 21.36% N; found: 55.06% C, 5.43% H, 21.38% N. *R*_F = 0.63; IR cm⁻¹: 3432 (N-H), 1676 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 11.02 (bs, 1H, NH), 9.39 (d, 1H, *J*=1.37 Hz, H3), 8.66 (d, 1H, *J*=1.38 Hz, H6), 7.54 (d, 1H, *J*=3.58 Hz, H4'), 7.07 (d, 1H, *J*=3.57 Hz, H5'), and 1.45 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 168.8, 161.0, 157.4, 143.2, 139.7, 139.7, 138.1, 114.2, 37.2, and 29.7.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid thiazol-2-ylamide (4). Yield: 97%; m.p. 148-150 °C; For C₁₂H₁₃ClN₄OS (296.8) calculated: 48.56% C, 4.42% H, 18.88% N; found: 48.46% C, 4.65% H, 18.80% N; *R*_F = 0.88; IR cm⁻¹: 3448 (N-H), 1675 (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 12.49 (bs, 1H, NH), 9.17 (s, 1H, H3), 7.59 (d, 1H, *J*=3.6 Hz, H4'), 7.36 (d, 1H, *J*=3.6 Hz, H5'), and 1.50 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 163.6, 161.5, 158.2, 145.8, 141.7, 140.9, 137.7, 114.8, 38.8, and 28.2.

Pyrazine-2-carboxylic acid (4-methylthiazol-2-yl)amide (5). Yield: 67%; m.p. 144-145 °C; For C₉H₈N₄OS (220.3) calculated: 49.08% C, 3.66% H, 25.44% N; found: 48.93% C, 3.78% H, 25.63% N;

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

250

$R_F = 0.50$; IR cm^{-1} : 3433 (N-H), 1670 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.27 (bs, 1H, NH), 9.20 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H3), 8.95 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H6), 7.88 (m, 1H, H5), 6.90 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H5'), and 2.40 (s, 3H, $J=1.0$ Hz, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 164.0, 163.6, 148.0, 147.8, 147.5, 145.6, 139.7, 111.2, and 17.7.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (4-methylthiazol-2-yl)amide (6). Yield: 97%; m.p. 192-194 °C; For C₉H₇ClN₄OS (254.7) calculated: 42.44% C, 2.77% H, 22.00% N; found: 42.37% C, 2.70% H, 22.13% N; $R_F = 0.74$; IR cm^{-1} : 3434 (N-H), 1675 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.54 (bs, 1H, NH), 9.23 (s, 1H, H3), 9.04 (s, 1H, H5), 6.90 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H5'), and 2.30 (d, 3H, $J=1.0$ Hz, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 162.0, 158.3, 147.9, 147.5, 145.9, 144.5, 142.8, 109.0, and 16.7.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (4-methylthiazol-2-yl)amide (7). Yield: 33%; m.p. 84-85 °C; For C₁₃H₁₆N₄OS (276.4) calculated: 56.50% C, 5.84% H, 20.27% N; found: 56.44% C, 5.96% H, 20.18% N; $R_F = 0.69$; IR cm^{-1} : 3434 (N-H), 1676 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.22 (bs, 1H, NH), 9.20 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H3), 8.89 (d, 1H, $J=1.5$ Hz, H6), 6.90 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H5'), 2.30 (d, 3H, $J=1.0$ Hz, CH₃), and 1.39 (s, 9H, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 167.5, 162.3, 157.0, 147.1, 142.9, 141.4, 140.7, 109.0, 37.1, 29.6, and 17.0.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (4-methylthiazol-2-yl)amide (8). Yield: 97%; m.p. 118-120 °C; For C₁₃H₁₅ClN₄OS (310.8) calculated: 50.24% C, 4.86% H, 18.03% N; found: 50.17% C, 4.99% H, 18.09% N; $R_F = 0.91$; IR cm^{-1} : 3451 (N-H), 1675 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.47 (bs, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, H3), 6.89 (d, 1H, $J=1.0$ Hz, H5'), 2.30 (d, 3H, $J=1.0$ Hz, CH₃), and 1.49 (s, 9H, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 163.5, 161.7, 146.2, 145.8, 142.1, 141.8, 140.8, 108.9, 38.7, 28.2, and 16.8.

Pyrazine-2-carboxylic acid (5-methylthiazol-2-yl)amide (9). Yield: 66%; m.p. 247-248 °C; For C₉H₈N₄OS (220.3) calculated: 49.08% C, 3.66% H, 25.44% N; found: 49.03% C, 3.51% H, 25.32% N; $R_F = 0.42$; IR cm^{-1} : 3435 (N-H), 1672 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.46 (bs, 1H, NH), 9.20 (d, 1H, $J=1.65$ Hz, H3), 8.91 (d, 1H, $J=1.65$ Hz, H6), 8.73-8.70 (m, 1H, H5), 7.28 (s, 1H, H4'), and 2.38 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 163.0, 158.3, 148.0, 147.8, 147.5, 143.9, 136.8, 127.4, and 11.5.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (5-methylthiazol-2-yl)amide (10). Yield: 98%; m.p. 214-215 °C; For C₉H₇ClN₄OS (254.7) calculated: 42.44% C, 2.77% H, 22.00% N; found: 42.53% C, 2.70% H, 21.95% N; $R_F = 0.79$; IR cm^{-1} : 3436 (N-H), 1672 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.56 (bs, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, H3), 9.05 (s, 1H, H5), 7.27 (s, 1H, H4'), and 2.39 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 161.7, 157.1, 147.9, 147.5, 144.5, 142.8, 134.1, 127.4, and 11.5.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (5-methylthiazol-2-yl)amide (11). Yield: 33%; m.p. 114-116 °C; For C₁₃H₁₆N₄OS (276.4) calculated: 56.50% C, 5.84% H, 20.27% N; found: 56.59% C, 5.80% H, 20.36% N; $R_F = 0.80$; IR cm^{-1} : 3435 (N-H), 1677 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), δ : 12.12 (bs, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, H3), 8.88 (s, 1H, H6), 7.24 (s, 1H, H4'), 2.38 (s, 3H, $J=1.0$ Hz, CH₃), and 1.39 (s, 9H,

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

251

CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 167.5, 162.0, 155.8, 142.9, 141.4, 140.6, 135.2, 127.6, 37.1, 29.6, and 11.4.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (5-methylthiazol-2-yl)amide (12). Yield: 98%; m.p. 152-153 °C; For C₁₃H₁₅ClN₄OS (310.8) calculated: 50.24% C, 4.86% H, 18.03% N; found: 50.37% C, 4.69% H, 17.79% N; R_F = 0.85; IR cm⁻¹: 3453 (N-H), 1678 (C=O); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 12.45 (bs, 1H, NH), 9.15 (d, 1H, *J*=0.5 Hz, H3), 7.27-7.24 (m, 1H, H4'), and 2.38 (d, 3H, *J*=0.5 Hz, CH₃), 1.49 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆), δ: 163.4, 161.4, 156.7, 145.8, 141.8, 140.8, 134.4, 127.4, 38.7, 28.2, and 11.4.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (2-bromophenyl)amide (13). Yield: 24%; m.p. 118-119 °C; For C₁₁H₇BrClN₃O (312.6) calculated: 42.27% C, 2.26% H, 13.44% N; found: 42.31% C, 2.17% H, 13.28% N; R_F = 0.86; IR cm⁻¹: 3436 (N-H), 1701 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 10.11 (bs, 1H, NH), 9.39 (d, 1H, *J*=0.55 Hz, H3), 8.83 (d, 1H, *J*=0.55 Hz, H5), 8.55 (dd, 1H, *J*=1.65 Hz, H6'), 7.61 (dd, 1H, *J*=7.97 Hz, *J*=1.37 Hz, H3'), 7.43-7.35 (m, 1H, H5'); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 159.5, 147.8, 147.6, 143.8, 142.1, 135.0, 132.6, 128.5, 126.0, 121.6, and 114.1.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (2-bromophenyl)amide (14). Yield: 20%; m.p. 83-84 °C. For C₁₅H₁₆BrN₃O (334.2) calculated: 53.91% C, 4.83% H, 12.57% N; found: 54.13% C, 4.91% H, 12.68% N; R_F = 0.94; IR cm⁻¹: 3439 (N-H), 1693 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 10.35 (bs, 1H, NH), 9.39 (d, 1H, *J*=1.37 Hz, H3), 8.71 (d, 1H, *J*=1.65 Hz, H6), 8.62 (dd, 1H, *J*=8.24 Hz, *J*=1.65 Hz, H6'), 7.59 (dd, 1H, *J*=8.25 Hz, *J*=1.65 Hz, H3'), 7.42-7.34 (m, 1H, H4'), 7.03 (dd, 1H, *J*=7.42 Hz, *J*=1.65 Hz, H5'), and 1.45 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 168.0, 161.3, 143.0, 141.3, 139.4, 135.5, 132.5, 128.4, 125.4, 121.4, 113.8, 37.1, and 29.7.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (2-bromophenyl)amide (15). Yield: 17%; m.p. 116-117 °C; For C₁₅H₁₅BrClN₃O (368.7) calculated: 48.87% C, 4.10% H, 11.40% N; found: 48.56% C, 4.21% H, 11.28% N; R_F = 0.92; IR cm⁻¹: 3435 (N-H), 1701 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 10.11 (bs, 1H, NH), 9.39 (s, 1H, H3), 8.83 (s, 1H, H5), 8.55 (dd, 1H, *J*=8.24 Hz, *J*=1.37 Hz, H6'), 7.61 (dd, 1H, *J*=8.24 Hz, *J*=1.37 Hz, H3'), 7.43-7.35 (m, 1H, H4'), 7.09-7.03 (m, 1H, H5'); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 159.8, 148.0, 147.9, 144.1, 142.3, 135.2, 132.8, 128.7, 126.2, 121.8, 114.4, 37.0, and 29.7.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)amide (16). Yield: 14%; m.p. 191-193 °C; For C₁₁H₆Br₂ClN₃O₂ (407.5) calculated: 32.43% C, 1.48% H, 10.31% N; found: 32.33% C, 1.41% H, 10.27% N; R_F = 0.89; IR cm⁻¹: 3432 (N-H), 1685 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 10.74 (bs, 1H, NH), 9.86 (bs, 1H, OH), 9.20 (d, 1H, *J*=0.55 Hz, H3), 9.05 (d, 1H, *J*=0.5 Hz, H5), and 8.13 (s, 2H, H2', H6'); ¹³C-NMR (CDCl₃), δ: 160.8, 147.8, 147.8, 147.1, 144.8, 142.5, 132.4, 124.7, and 111.8.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)amide (17). Yield: 24%; m.p. 206-208 °C; For C₁₅H₁₅Br₂N₃O₂ (429.1) calculated: 41.99% C, 3.52% H, 9.79% N; found: 42.11% C, 3.41% H, 10.02% N; R_F = 0.95; IR cm⁻¹: 3432 (N-H), 1695 (C=O); ¹H-NMR (CDCl₃), δ: 9.38 (d, 1H, *J*=0.55 Hz, H3), 9.29 (bs, 1H, NH), 8.83 (d, 1H, *J*=0.55 Hz, H5), 7.96 (s, 2H, H2', H6'), 5.84 (s, 1H,

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

253

13.23% N; $R_F = 0.90$; IR cm^{-1} : 3360 (NH), 2961, 2838 (OCH₃), 1690 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.62 (bs, 1H, NH), 9.38 (d, 1H, $J=1.37$ Hz, H3), 8.62 (d, 1H, $J=1.38$ Hz, H6), 7.00 (d, 2H, $J=2.20$ Hz, H2', H6'), 6.29 (t, 1H, $J=2.20$ Hz, H4'), 3.82 (s, 6H, OCH₃), and 1.44 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 167.8, 161.1, 161.1, 142.9, 141.3, 139.1, 139.0, 97.9, 97.2, 55.4, 37.1, and 29.7.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (3,5-dimethoxyphenyl)amide (24). Yield: 49%; m.p. 123-124 °C; For C₁₇H₂₀ClN₃O₃ (349.8) calculated: 58.37% C, 5.76% H, 12.01% N; found: 58.57% C, 5.91% H, 12.05% N; $R_F = 0.92$; IR cm^{-1} : 3376 (NH), 2960, 2839 (OCH₃), 1698 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.31 (bs, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H3), 6.99 (d, 2H, $J=2.20$ Hz, H2', H6'), 6.30 (t, 1H, $J=2.20$ Hz, H4'), 3.82 (s, 6H, OCH₃), and 1.55 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.6, 161.1, 159.8, 145.7, 141.0, 140.2, 138.7, 98.1, 97.5, 55.4, 39.0, and 28.3.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (5-bromo-2-hydroxyphenyl)-amide (25). Yield: 71%; m.p. 154-155 °C; For C₁₁H₇BrClN₃O₂ (328.6) calculated: 40.21% C, 2.15% H, 12.79% N; found: 40.51% C, 1.93% H, 13.05% N; $R_F = 0.85$; IR cm^{-1} : 3370 (NH), 1682 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.27 (bs, 1H, NH), 9.22 (d, 1H, $J=1.1$ Hz, H3), 8.98 (d, 1H, $J=1.1$ Hz, H5), 7.74 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H2'), 7.02 (dd, 1H, H4'), 6.62 (d, 1H, H5'), and 5.06 (bs, 1H, OH); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 165.2, 149.4, 142.9, 141.1, 139.0, 131.2, 128.5, 123.6, 120.9, 116.1, and 110.1.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (5-bromo-2-hydroxyphenyl)amide (26). Yield: 86%; m.p. 184-185 °C; For C₁₅H₁₆BrN₃O₂ (350.2) calculated: 51.44% C, 4.60% H, 12.00% N; found: 51.39% C, 5.61% H, 11.94% N; $R_F = 0.82$; IR cm^{-1} : 3368 (NH), 1685 (CO); ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.55 (bs, 1H, NH), 9.37 (d, 1H, $J=1.1$ Hz, H3), 8.60 (d, 1H, $J=1.1$ Hz, H6), 8.08 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H3'), 7.47 (dd, 1H, $J=8.79$ Hz, $J=2.47$ Hz, H5'), 7.02 (d, 1H, $J=8.79$ Hz, H6'), 5.66 (bs, 1H, OH), and 1.44 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 167.9, 161.0, 149.4, 142.9, 141.1, 139.0, 131.2, 123.6, 120.9, 116.1, 110.1, 37.1, and 29.7.

5-tert-Butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (5-bromo-2-hydroxyphenyl)amide (27). Yield: 77%; m.p. 160-161 °C; For C₁₅H₁₅BrClN₃O₂ (384.7) calculated: 46.84% C, 3.93% H, 10.92% N; found: 47.09% C, 4.12% H, 11.13% N; $R_F = 0.86$; IR cm^{-1} : 3373 (NH), 1691 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.28 (bs, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H3), 8.06 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H3'), 7.49 (dd, 1H, $J=8.79$ Hz, $J=2.47$ Hz, H5'), 7.03 (d, 1H, $J=8.79$ Hz, H6'), 5.65 (bs, 1H, OH), and 1.55 (s, 9H, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 164.7, 159.7, 149.7, 145.8, 140.8, 140.2, 130.8, 123.8, 121.2, 116.1, 110.1, 39.0, and 28.3.

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (3,4-dichlorophenyl)amide (28). Yield: 83%; m.p. 132-133 °C; For C₁₁H₆Cl₂N₃O (302.5) calculated: 43.67% C, 2.00% H, 13.89% N; found: 43.51% C, 1.78% H, 14.11% N; $R_F = 0.88$; IR cm^{-1} : 3370 (NH), 1690 (CO); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 9.41 (bs, 1H, NH), 9.38 (s, 1H, H3), 8.83 (s, 1H, H5), 8.00 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H2'), 7.59 (dd, 1H, $J=8.79$ Hz, $J=2.47$ Hz, H6'), and 7.45 (d, 1H, $J=8.79$ Hz, H5'); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ 159.3, 147.8, 147.4, 143.2, 142.1, 136.1, 132.9, 130.7, 130.6, 128.3, 121.5, and 119.0.

5-tert-Butylpyrazine-2-carboxylic acid (3,4-dichlorophenyl)amide (29). Yield: 76%; m.p. 143-144 °C; For C₁₅H₁₅Cl₂N₃O (324.2) calculated: 55.57% C, 4.66% H, 12.96% N; found: 55.63% C, 4.71% H,

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

254

13.08% N; $R_F = 0.92$; IR cm^{-1} : 3365 (NH), 1685 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.67 (bs, 1H, NH), 9.37 (d, 1H, $J=1.37$ Hz, H3), 8.61 (d, 1H, $J=1.37$ Hz, H6), 8.01 (d, 1H, $J=2.48$ Hz, H2'), 7.58 (dd, 1H, $J=8.79$ Hz, $J=2.47$ Hz, H6'), 7.43 (d, 1H, $J=8.79$ Hz, H5'), and 1.45 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 168.2, 161.2, 143.0, 140.7, 139.0, 136.9, 133.0, 130.6, 127.7, 121.3, 118.9, 37.1, and 29.7.

5-tert-Butyl-6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (3,4-dichlorophenyl)amide (30). Yield: 83%, m.p. 113-114 °C For $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}$ (358.7) calculated: 50.23% C, 3.93% H, 11.72% N; found: 55.63% C, 4.71% H, 13.08% N; $R_F = 0.95$; IR cm^{-1} : 3390 (NH), 1685 (CO); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.38 (bs, 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H3), 8.01 (d, 1H, $J=2.47$ Hz, H2'), 7.59 (dd, 1H, $J=8.79$ Hz, $J=2.48$ Hz, H6'), and 7.44 (d, 1H, $J=8.79$ Hz, H5'), 1.55 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 165.1, 159.9, 145.8, 140.5, 140.3, 136.5, 133.0, 130.7, 128.2, 121.6, 119.1, 39.1, and 28.2.

Antimycobacterial assay

Antimycobacterial evaluation was carried out at the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF), Southern Research Institute, Birmingham, AL, USA, which is a part of the National Institutes of Health (NIH). Primary screening of all compounds was conducted at $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv in BACTEC 12B medium using the BACTEC 460 radiometric system [22,23]. The results are presented in Table 1.

In vitro antifungal susceptibility testing

The broth microdilution test [24,14] was used for the assessment of *in vitro* antifungal activity of the synthesized compounds against *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigelii* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC), and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM). Fluconazole was used as a reference drug. The procedure was performed with twofold dilution of the compounds in RPMI 1640 medium (Sevapharma) buffered to pH 7.0 with 0.165 mol of 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid. The final concentrations of the compounds ranged from 500 to $0.975 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Drug-free controls were included. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined after 24 h and 48 h of static incubation at 35 °C. With *T. mentagrophytes*, the final MICs were determined after 72 h and 120 h of incubation. The results of all compounds *in vitro* tested against *T. mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain, are summarized in Table 1.

Study of inhibition of oxygen evolution rate in spinach chloroplasts

The inhibition of oxygen evolution rate (OER) in spinach chloroplasts by the studied compounds was investigated spectrophotometrically (Specord UV VIS, Zeiss, Jena) in the presence of an electron acceptor 2,6-dichlorophenol-indophenol, using method described in Ref. [25]. The compounds were dissolved in DMSO because of their low water solubility. The used DMSO volume fractions (up to 5 vol. %) did not affect the oxygen evolution. The inhibitory efficiency of the studied compounds has been expressed by IC₅₀ values, i.e. by molar concentration of the compounds causing 50% decrease in

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

255

the oxygen evolution relative to the untreated control. Comparable IC₅₀ value for a selective herbicide atrazine [26] is about 1.0 μmol·L⁻¹, the result are summarized in Table 1.

References

1. Blumberg, H.M.; Leonard, M.K.; Jasmer, R.M. Update on the treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *293*, 2776-2784.
2. Duncan, K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* **2003**, *83*, 201-207.
3. Fromtling, R.A. Current developments in antibacterial and antifungal chemotherapy. *Drug News Perspect.* **1997**, *10*, 557-572.
4. Zhang, Y.; Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6-21.
5. Dlabal K., Dolezal M., Machacek M. Preparation of some 6-substituted *N*-pyrazinyl-2-pyrazinecarboxamides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1993**, *58*, 452-454.
6. Miletin, M.; Hartl, J.; Machacek, M. Synthesis of some anilides of 2-alkyl-4-pyridinecarboxylic acids and their photosynthesis-inhibiting activity. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 672-678.
7. Dolezal, M.; Hartl, J.; Miletin, M.; Machacek, M.; Kralova K. Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* **1999**, *53*, 126-130.
8. Dolezal, M.; Vicik, R.; Miletin, M.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* **2000**, *54*, 245-248.
9. Dolezal, M.; Miletin, M.; Kunes, J.; Kralova, K. Synthesis and biological evaluation of some amides of pyrazine-2-carboxylic acids. *Molecules* **2002**, *7*, 363-373.
10. Good, N.E. Inhibitors of the Hill reaction. *Plant. Physiol.* **1961**, *36*, 788-803.
11. Kralova, K.; Sersen, F.; Cizmarik, J. Dimethylaminoethyl alkoxyphenylcarbamates as photosynthesis inhibitors. *Chem. Pap.* **1992**, *46*, 266-268.
12. Kralova, K.; Sersen, F.; Miletin, M.; Hartl, J. Inhibition of photosynthetic electron transport by some anilides of 2-alkylpyridine-4-carboxylic acids in spinach chloroplasts. *Chem. Pap.* **1998**, *52*, 52-55.
13. Kubicova, L.; Sustr M.; Kralova, K.; Chobot, V.; Vytlacilova, J.; Jahodar, L.; Vuorela P.; Machacek, M.; Kaustova J. Synthesis and biological evaluation of quinazoline-4-thiones. *Molecules* **2003**, *8*, 756-769.
14. Dolezal, M.; Jampílek, J.; Osicka, Z.; Kunes, J.; Buchta, V.; Vichova, P. Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco* **2003**, *58*, 1105-1111.
15. Dolezal, M.; Hartl, J.; Miletin, M. Antimycobacterial evaluation of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acid. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2000**, *25*, 15-19.
16. Kushner, S.; Dalalian, H.; Sanjurjo, J.L.; Bach, F.L.; Safir, S.R.; Smith, V.K.; Williams, J.H. Experimental chemotherapy of tuberculosis. II. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617-3621.

Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Kráľová K.:
Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation.
Molecules **11** (4), 242-256 (2006). ISSN 1420-3049, IF₂₀₀₆ =
0.841

Molecules **2006**, *11*

256

17. Avdeef, A. Psysicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Topics Med. Chem.*, **2001**, *1*, 277-351.
18. Pliska, V. Lipophilicity: the empirical tool and the fundamental objective. In *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*; Pliska, V.; Testa, B.; van der Waterbeemd, H. eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **1996**; pp. 1-6.
19. Valko, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1037*, 299-310.
20. Foks, H.; Sawlewicz, J. N-Oxides of pyrazine-2-carboxylic acid. *Acta Polon. Pharm.* **1964**, *21*, 429-436.
21. Abe, Y.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F.; Okada, S.; Ozasayama, E. Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. *Japan.* **1969**, *69* 12,898; *Chem. Abstr.* **1969**, *71*, 112979y.
22. <http://www.taacf.org/about-TAACF.htm> (19 July 2005).
23. Collins, L.; Franzblau, S.G. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1004-1009.
24. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Proposed Standard M 27-P, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, **1992**.
25. Jegerschold, C.; Styring, S. Fast oxygen-independent degradation of the D1 reaction center protein in photosystem-II. *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 87-90.
26. Carpentier, R.; Fuerst, E.P.; Nakatani, H.Y.; Arntzen, C.J. A 2nd site for herbicide action in photosystem-II. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *808*, 293-299.
27. Dolezal, M.; Hartl, J.; Lycka, A.; Buchta, V.; Odlerova, Z. Synthesis and Antituberculotic Properties of Some Substituted Pyrazinecarbothioamides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1102-1108.

Sample availability: Available from the authors.

© 2006 by MDPI (<http://www.mdpi.org>). Reproduction is permitted for noncommercial purposes.

Palek L., Dvořák J., Svobodová M., Buchta V., Jampílek J., Doležal M.:
Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-
2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie* 341 (1), 61-65 (2008). IF₂₀₀₇ =
1.300

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2008, 341, 61–65

61

Full Paper

Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles

Lukáš Palek¹, Jaroslav Dvořák¹, Michaela Svobodová², Vladimír Buchta², Josef Jampílek³,
Martin Doležal¹

¹ Department of Medicinal Chemistry and Drug Control, Charles University Prague, Faculty of Pharmacy in
Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Clinical Microbiology, Charles University Prague, Faculty of Medicine and University Hospital
in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

³ Zentiva a. s., Prague, Czech Republic

This paper describes preparation and biological evaluation of pyrazinamide analogues. Pyrazinamide with its simple structure gives a good opportunity for further modification regarding an increase of its antimycobacterial activity. We prepared a series of compounds derived from pyrazine-2,5-dicarbonitrile with arylamino substitution in position 3. All compounds were assayed *in vitro* against major *Mycobacterium* and various Fungi species. The best activity was found in 3-{{3-(trifluoromethyl)phenyl}amino}pyrazine-2,5-dicarbonitrile **11** with the value of 6.25 μmol^{-1} against *M. tuberculosis* H₃₇Rv and moderate activity against minor *Mycobacterium* pathogens.

Keywords: Antibacterial agents / Antimycotic activity / Antitubercular activity / Pyrazinamide analogues

Received: June 5, 2007; accepted: October 17, 2007

DOI 10.1002/ardp.200700119

Introduction

In recent days, the health of people, who live in so-called third-world countries, is becoming a problem of the whole world, because of globalization and traveling-business boom. Most of the health complications are in relationship with infectious diseases, such as AIDS, tuberculosis, sleeping sickness, or yellow fever. These are reasons having influenced the main priorities of the World Health Organization (WHO) global healthcare program [1] or European Union Sixth Framework Research Program [2].

Current treatment of tuberculosis consists in the combination of two to four drugs with different modes of action for three to nine months of continuous therapy [3]. In fact, conditions of medical care in poor countries and the increased resistance of *Mycobacterium* genus has

made defeating tuberculosis worldwide very difficult. Therefore, here is an urgent need for new drugs with novel modes of action and higher selectivity and biological activity.

Our research follows the pathway of known drug-analogues preparation [4, 5]. Various pyrazine derivatives exhibit a wide range of biological actions including anti-infective activity [6]. This study deals with pyrazinamide analogues and shows structures derived from newly prepared 3-chloropyrazine-2,5-dicarbonitrile that are formed by nucleophilic substitution of chlorine in position 3. Reports that 5-chloropyrazine-2-carboxamide has a different mode of action compared to pyrazinamide itself makes this direction in research more than relevant [7]. We chose 5-chloropyrazine-2,5-dicarbonitrile – that shows good activity itself – as our model compound [8].

Results and discussion

Twelve compounds were prepared of which nine were new and not described so far in the literature. We fully characterized all of them and they were screened for anti-tuberculosis and/or antifungal activity.

Correspondence: Martin Doležal, Department of Medicinal Chemistry and Drug Control, Charles University Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
E-mail: Martin.Dolezal@faf.cuni.cz
Fax: +420 49 551-2423

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

 WILEY
InterScience
DISCOVER SOMETHING GREAT

Palek L., Dvořák J., Svobodová M., Buchta V., Jampílek J., Doležal M.:
 Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-
 2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie* 341 (1), 61-65 (2008). IF₂₀₀₇ =
 1.300

Table 2. Antifungal and antituberculosis activities of the presented compounds.

Strain Compound Nr.	CA	CT	CK	CG	TB	AF	AC	TM	Mycobacterium				
									kansaii 80/72	avium 80/72	avium 152/74	tuberculosis H ₃₇ Rv	
									(μmol/L)				
4	3,90	15,62	31,25	7,81	15,62	7,81	15,62	15,62	c)	c)	c)	c)	c)
5	15,63	15,63	15,63	31,25	31,25	15,63	31,25	15,63	16	>128	>128	16	28
6	62,5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125	32	64	>128	>128	0
7	125	250	500	500	>500	125	500	62,5	>128	>128	>128	16	58
8	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	64	128	>128	16	53
9	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	c)	c)	c)	c)	c)
10	62,5	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125	128	>128	>128	16	33
11	62,5	125	125	125	125	125	125	125	128	>128	>128	8	94 ^{d)}
12	3,91	15,63	7,82	15,63	15,63	7,82	31,25	31,25	16	128	>128	32	16
Fluconazole	0,06	0,12	3,91	0,98	0,24	>125	>125	1,95	>128	>128	>128	6 to 60 ^[10]	

^{a)} MIC determination by the University Hospital in Hradec Králové [12].

^{b)} TAACF screening; data given in % of inhibition at 6.25 μmol/L.

^{c)} no data available at the time of publication.

^{d)} structure released into level 2 of TAACF screening [10].

See Table 3 for further data. Fungi strains are given in abbreviations: CA – *Candida albicans*; CT – *Candida tropicalis*; CK – *Candida krusei*; CG – *Candida glabrata*; TB – *Trichosporon beigeli*; AF – *Aspergillus fumigatus*; AC – *Absidia corymbifera*; TM – *Trichophyton mentagrophytes*.

Table 3. TAACF data report – MIC determination, IC₅₀ determination and calculated SI (selectivity index).

Compound	Inhibition (%)	Assay	MIC (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)	SI
11	94	Alamar	6.25	2.86	0,45

All prepared compounds underwent biological activity screening. The compounds 1 and 12 showed the best antifungal activities whereas compound 11 reached the best anti-tuberculosis activity (Table 2). Structure 11 was released into level 2 of anti-tuberculosis screening. It was found that this compound has a high cytotoxicity (Table 3) and a low selectivity index, therefore it was not evaluated further. More structures have to be described to conclude more structure-activity relationships.

This study was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM002160822). Antimycobacterial data were provided by the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF) through a research and development contract with the U. S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

The authors have declared no conflict of interest.

Experimental

General experimental details

All reactions were run with newly purchased chemicals; where relevant, a protective atmosphere of argon was used. All used sol-

vents were dried or redistilled. Reaction kinetics was checked using Merck UV 254 TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Purification of compounds was made using Flash Master Personal chromatography system from Argonaut Chromatography (Argonaut Technologies, Redwood City, CA, USA). As sorbent, Merck silica gel 60 with 40–63 μm granity was used (Merck). ¹H- and ¹³C-NMR spectra were taken on Varian Mercury VX-BB 300 at 300 and 75 MHz, respectively (Varian, Palo Alto CA, USA). (CH₃)₄Si was used as an inner standard. Microanalyses were recorded on Fisons Instruments EA1110CE CHN analyst (Fisons Instruments, Mainz, Germany). Mass spectra were taken using Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Infrared spectra were taken at Nicolet Impact 400 in KBr blocks (Nicolet, Madison, WI, USA). The purity of the compounds was checked by HPLC. The detection wavelength of 210 nm was chosen. Peaks in the chromatogram of the solvent (blank) were deducted from peaks in the chromatogram of the sample solution. The purity of the individual compounds was determined from the area peaks in the chromatogram of the sample solution. UV spectra (λ, nm) were determined on a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, USA) in acetonitrile solution (approx. 3 · 10⁻⁴ M).

HPLC lipophilicity determination (capacity factor *K'* calculated log *K*)

The HPLC separation module Waters Alliance 2695 XE and Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, USA) were used. The chromatographic column Symmetry[®] C₁₈ 5 μm, 4.6 × 250 mm, Part No. WAT054275, (Waters Corp.) was used. The HPLC separation process was monitored by Millennium³² Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp.). A mixture of MeOH (p.a., 70%) and H₂O-HPLC Milli-Q Grade (30.0%) was used as mobile phase. The total flow of the column was 1.0 mL/min, injection 30 μL, column temperature

Palek L., Dvořák J., Svobodová M., Buchta V., Jampílek J., Doležal M.:
Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-
2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie* 341 (1), 61-65 (2008). IF₂₀₀₇ =
1.300

64 L. Palek *et al.*

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2008, 341, 61 – 65

30°C and sample temperature 10°C; as detection wavelength, 210 nm was chosen. The KI acetonitrile solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) were measured in minutes.

The capacity factors K were calculated using the Millennium³² Chromatography Manager Software according to the formula $K = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute, and T_D denotes the dead time obtained via an unretained analyte. $\log K$, calculated from the capacity factor K , is used as the lipophilicity index converted to $\log P$ scale. Distributive parameters π have been firmly established as the parameter of choice for correlating both binding to biological macromolecules and transport through a biological system [11]. Constant π describes the lipophilicity contribution of individual moieties substituted in the same skeleton. These π parameters characterizing hydrophobicity of the individual substituents were calculated according to the formula $\pi = \log K_S - \log K_U$, where $\log K_S$ is the determined capacity-factor logarithm of the individual substituted compounds, and $\log K_U$ denotes the determined capacity-factor logarithm of the unsubstituted compound 3pne-pyrazinopyrazine-2,5-dicarbonitrile.

Lipophilicity calculations

$\log P$, i. e. the logarithm of the partition coefficient for *n*-octanol/water, was calculated using the programs CS ChemOffice Ultra ver. 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) and ACD/Log P ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). $\log P$ values (the logarithm of *n*-octanol/water partition coefficient based on established chemical interactions) were generated by means of CS ChemOffice Ultra ver. 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) software.

Synthesis

3-Chloro-5-cyanopyrazine-2-carboxamide 3

Pyrazinamide was used as a starting material. The method used is described elsewhere [16], briefly, pyrazinamide was oxidized to give pyrazinamide-*N*-oxide 1a–1c, the oxide was then reduced to 6-chloropyrazine-2-carbonitrile 2a–2c and further reacted using formamide and ammonium persulfate to give 3-chloro-5-cyanopyrazine-2-carboxamide.

6-Chloropyrazine-2,5-dicarbonitrile 4

3-Chloro-5-cyano-pyrazine-2-carboxamide was dissolved in phosphorochloride and heated to 90°C. The mixture was kept at this temperature for one hour, than cooled and poured drop-by-drop onto ice. Formed crystals were filtered off and the solution extracted with chloroform. The pure compound was crystallized from water/ethanol. Yield: 66%; mp. 116–118°C; ¹H-NMR (DMSO): 9.41 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO): 153.24, 148.34, 135.65, 133.30, 117.14, 115.67; IR (KBr): 3310, 2260, 1660, 1525; LRMS (m/z) 165 [M + 1]; Anal. Calcd for C₆HClN₄ (164.55): C, 43.79; H, 0.61; Cl, 21.55; N, 34.05. Found: C, 43.70; H, 0.55; N, 34.08.

General coupling method (final compound formation)

To a solution of 6-chloropyrazine-2,5-dicarbonitrile in toluene was added one equivalent of ring-substituted aniline and 1,1 equivalent of pyridine as a base. The reaction mixture was heated to reflux overnight. Then, the solvent was removed, the crude compound was dissolved in ethyl acetate and dried over Na₂SO₄. The solvent was then removed and the mixture was purified

using flash chromatography with gradient of elution from 0% to 20% ethyl acetate in hexane. Finally, the compound was crystallized from water/ethanol.

3-(3-Chlorophenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 5

General coupling procedure was used. Yield: 25%; mp. 197–199°C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.52 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.51 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.4 (t, 1H, $J = 2.06$ Hz), 7.1 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 154.05, 147.15, 139.56, 132.13, 130.88, 130.55, 122.46, 121.52, 121.05, 120.88, 115.64, 114.78; IR (KBr): 3305, 2258, 1662, 1510; LRMS (m/z) 254 [M – 1]. Anal. Calcd for C₁₂H₆ClN₅ (255.7): C, 56.37; H, 2.37; N, 27.39. Found: C, 56.4; H, 2.35; N, 27.4.

3-(3,5-Dibromo-4-hydroxyphenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 6

General coupling procedure was used. Yield: 40%; mp. 199–201°C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.95 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 6.9 (s, 2H); ¹³C-NMR (DMSO): δ 158.54, 150.08, 145.15, 139.17, 130.00, 120.79, 120.70, 115.70, 114.35, 112.95, 110.65, 110.55; IR (KBr) 3510, 3295, 2265, 1655, 1530; LRMS (m/z) 394 [M – 1]. Anal. Calcd for C₁₂H₆Br₂N₅O (395.01): C, 36.49; H, 1.28; N, 17.73. Found: C, 36.50; H, 1.29; N, 17.71.

3-(4-Fluorophenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 7

General coupling procedure was used. Yield: 65%; mp. 182–184°C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.25 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.35 (dd, 2H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.9$ Hz), 7.25 (dd, 2H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.9$ Hz); ¹³C-NMR (DMSO): δ 159.23, 156.15 (d, $J = 239.1$ Hz), 145.00 (d, $J = 2.9$ Hz), 140.03, 127.25 (d, $J = 7.8$ Hz), 122.05, 122.05 (d, $J = 7.5$ Hz), 115.78, 114.95, 114.74, 114.87 (d, $J = 27.9$ Hz), 114.28; IR (KBr): 3310, 2245, 1665, 1515; LRMS (m/z) 238 [M – 1]. Anal. Calcd for C₁₂H₆FN₅ (239.21): C, 60.25; H, 2.53; N, 29.28. Found: C, 60.23; H, 2.52; N, 29.26.

3-(2-Hydroxy-4-nitrophenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 8

To a solution of 6-chloropyrazine-2,5-dicarbonitrile in dimethyl formamide was added one equivalent of 4-amino-3-nitrophenol and 1.1 equivalent of pyridine. The reaction was heated to reflux overnight. Then, the solvent was removed, the reaction mixture was dissolved in ethyl acetate, and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed and the compound was purified using flash chromatography with a gradient of elution from 0% to 15% ethyl acetate in hexane. The pure compound was crystallized from water. Yield: 58%; mp. 148–151°C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.82 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 8.14 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 7.8 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz); ¹³C-NMR (DMSO): δ 152.23, 150.95, 144.04, 141.02, 139.87, 129.10, 124.63, 120.96, 117.24, 115.07, 114.96, 102.45; IR (KBr): 3298, 2258, 1660, 1523; LRMS (m/z) 281 [M – 1]; Anal. Calcd for C₁₂H₆N₆O₃ (282.21): C, 51.07; H, 2.14; N, 29.78. Found: C, 51.08; H, 2.13; N, 29.79.

3-(2-Mercaptophenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 9

General coupling procedure was used. Yield: 80%; mp. 227–230°C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.15 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.60 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.05 (m, 2H), 6.65 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 3.50 (s, 1H); ¹³C-NMR (DMSO): δ 157.08, 149.90, 140.95, 138.18, 130.50, 130.05, 123.15, 121.04, 116.55, 116.05, 115.94, 115.05; IR (KBr): 3355, 3015, 2570, 2262, 1650, 1520; LRMS (m/z) 252 [M – 1]; Anal. Calcd for

Palek L., Dvořák J., Svobodová M., Buchta V., Jampílek J., Doležal M.:
Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-
2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie* 341 (1), 61-65 (2008). IF₂₀₀₇ =
1.300

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2008, 341, 61–65

New Pyrazinamide Analogues as Potential Anti-Infectives

65

C₁₂H₈N₅S (253.28); C, 56.90; H, 2.79; N, 27.65. Found: C, 56.92; H, 2.80; N, 27.64.

3-[[2-(Trifluoromethyl)phenyl]amino]pyrazine-2,5-dicarbonitrile 10

General coupling procedure was used. Yield: 83%; mp. 185–187 °C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.65 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.85 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.5 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 7.35 (t, 1H, J = 1.9 Hz), 7.25 (t, 1H, J = 1.7 Hz); ¹³C-NMR (DMSO): δ 165.15, 143.20 (q, J = 22.4 Hz), 141.25, 130.45, 128.05, 126.16 (q, J = 15.2 Hz), 124.62 (q, J = 272.1 Hz), 121.95 (q, J = 6.1 Hz), 118.15 (q, J = 3.0 Hz), 117.55 (q, J = 75.4 Hz), 115.62, 115.24, 112.25; IR (KBr): 3300, 2250, 1660, 1500; LRMS (m/z) 288 [M – 1]; Anal. Calcd for C₁₂H₆F₃N₅ (289.22): C, 53.99; H, 2.09; N, 24.21. Found: C, 54.00; H, 2.08; N, 24.23.

3-[[3-(Trifluoromethyl)phenyl]amino]pyrazine-2,5-dicarbonitrile 11

General coupling procedure was used. Yield 63%; mp. 185–188 °C; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 9.35 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.85 (t, 1H, J = 2.0 Hz), 7.60 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.25 (d, 1H, J = 7.8 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 165.44, 152.2 (q, J = 8.5 Hz), 141.95, 130.05, 128.21 (q, J = 68.4 Hz), 126.25 (q, J = 8.7 Hz), 124.50, 122.16 (q, J = 275.2 Hz), 121.05 (q, J = 32 Hz), 118.05, 116.15, 115.00, 114.45; IR (KBr): 3230, 2260, 1655, 1510; LRMS (m/z) 288 [M – 1]; Anal. Calcd for C₁₂H₆F₃N₅ (289.22): C, 53.99; H, 2.09; N, 24.21. Found: C, 54.09; H, 2.01; N, 24.28.

3-(2-Cyano-4-nitrophenylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitrile 12

General coupling procedure was used. Yield 42%; mp. 195–197 °C; ¹H-NMR (DMSO): δ 9.65 (s, 1H), 9.05 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 8.25 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.65 (d, 1H, J = 8.3 Hz); ¹³C-NMR (DMSO): δ 165.87, 148.25, 142.28, 140.97, 135.64, 129.27, 125.74, 121.07, 118.45, 115.15, 114.19, 112.25, 104.85; IR (KBr) 3225, 2250, 1650, 1505; LRMS (m/z) 290 [M – 1]; Anal. Calcd for C₁₃H₅N₇O₂ (291.22): C, 53.61; H, 1.73; N, 33.67. Found: C, 53.48; H, 1.76; N, 33.54.

Biological evaluation

We used two antituberculosis assays and one antifungal assay.

All compounds were screened at the TAACF screening (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility by The National Institute of Health of the US government) [12]. This screening has three levels: To release a compound into a higher level of assays a successful result in previous level is necessary. The primary screen is conducted at 6.25 µg/mL (or molar equivalent of the highest molecular-weight compound in a series of congeners) against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) in BACTEC 12B medium using the Microplate Alamar Blue Assay (MABA) [13]. Compounds exhibiting fluorescence are tested in the BACTEC 460-radiometric system. In general, compounds effecting <90% inhibition in the primary screen (MIC > 6.25 µg/mL) were not further evaluated. Compounds relieved into level 2 underwent MIC and IC₅₀ determination followed by Selectivity Index calculation (SI, ratio of measured IC₅₀ to MIC). To be relieved to level 3 (*in-vivo* screening) the compound must exhibit SI > 10. None of the prepared structures was relieved to level 3.

Another antituberculosis assay was provided by the Faculty Hospital in Hradec Kralove and the assays were run under different conditions (different growth medium, more TBC genuses).

Used strains were: *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, and *Mycobacterium avium* My CNCTC 80/72. The culture were ten days old and the culture medium used was Šula's medium at pH6.0 and 37 °C; microdilution panel method. [14].

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy, Charles University, Prague, performs antifungal susceptibility assays. The method used is microdilution panel bouillon method with RPMI medium with glutamine as a growth medium. Incubation takes 28–48 h at atmospheric pressure, temperature 35 °C, and darkness [15]. Tested strains were: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon beigelii* 1188, *Trichophyton mentagrophytes* 445, *Aspergillus fumigatus* 231, and *Absidia corymbifera* 272.

References

- [1] XDR-ndash;TB UPDATE/E5> 2006: http://www.who.int/tb/xdr/dir_stb_message_25sep06/en/index.html (12. June 2007).
- [2] EU determined to eradicate TB: http://cordis.europa.eu/fetch?CALLER=EN_NEWS&ACTION=D&SESSION=&RCN=21787 (12. October 2006).
- [3] Treatment of tuberculosis: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5211a1.htm> (12. June 2007).
- [4] M. Doležal, M. Miletín, J. Kuneš, K. Králová, *Molecules* 2002, 7, 363–373.
- [5] M. Doležal, J. Jampílek, Z. Osicka, J. Kuneš, V. Buchta, P. Vichová, *Farmaco* 2003, 58, 1105–1111.
- [6] M. A. Hassan, S. E. Zayed, W. N. El-Gaziri, S. Metwally, *Arch. Pharm.* 1991, 324, 185–187.
- [7] M. H. Cynamon, R. J. Speirs, J. T. Welch, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 462–463.
- [8] K. Dlabal, K. Palat, A. Lycka, Z. Odlerova, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990, 55, 2493–2501.
- [9] J. Jampílek, M. Doležal, J. Kuneš, D. Šatínský, I. Raich, *Curr. Org. Chem.* 2005, 9, 49–60.
- [10] J. Jampílek, L. Palek, M. Doležal, *ECSOC–10*, 2006, November 1–30 <http://www.usc.es/congresos/ecsoc/10/GOS/a019/index.htm>.
- [11] F. E. Norrington, R. M. Hyde, S. G. Williams, R. J. Wootton, *Med. Chem.* 1975, 18, 604–607.
- [12] <http://www.taacf.org/about-TAACF.htm> (12. June 2007).
- [13] L. Collins, S. G. Franzblau, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997, 41, 1004–1009.
- [14] W. McDermott, R. Tompsett, *Am. Rev. Tuberc.* 1954, 70, 748–754.
- [15] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: Approved Standard, NCCLS document, M27–A; NCCLS: Villanova, PA, USA, 1997.
- [16] S. Kushner, H. Dalalian, J. L. Sanjurjo, F. L. Bach Jr., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 3617–3621.

Doležal M., Čmedlová P., Palek L., Vinšová J., Kuneš J., Buchta V., Jampílek J., Král'ová K.: Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazinecarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43 (5), 1105-1113 (2008). ISSN: 0223-5234, IF₂₀₀₇ = 2.301



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



European Journal of Medicinal Chemistry 43 (2008) 1105–1113

EUROPEAN JOURNAL OF
MEDICINAL
CHEMISTRY

<http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Short communication

Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides

Martin Doležal^{a,*}, Pavlina Čmedlová^a, Lukas Palek^a, Jarmila Vinšová^a, Jiri Kuneš^a, Vladimír Buchta^b, Josef Jampílek^c, Katarina Kralová^d

^a Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^b Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital, Charles University in Prague, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

^c Zentiva a.s., U Kabelovny 130, 102 37 Prague 10, Czech Republic

^d Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska Dolina, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

Received 15 February 2007; received in revised form 24 May 2007; accepted 12 July 2007

Available online 2 August 2007

Abstract

Unsubstituted, halogenated and/or alkylated pyrazine-2-carboxylic acid amides connected *via* –CONH– bridge with substituted anilines were synthesized using currently known synthetic pathways. The synthetic approach, analytical, spectroscopic, lipophilicity and biological data of 20 newly synthesized compounds are presented. Structure–activity relationships among the chemical structures, the antimycobacterial, antifungal, photosynthesis inhibiting and antialgal activity of the evaluated substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides are discussed. 5-*tert*-Butyl-6-chloro-*N*-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**19**) has shown the highest activity against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (MIC = 3.13 μg/mL). The highest antifungal effect against *Trichophyton mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain tested, was found for *N*-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**14**, MIC = 62.5 μmol/mL). The highest reduction of chlorophyll content in *Chlorella vulgaris* was found for pyrazine-2-carboxylic acid (3-trifluoromethylphenyl)amide (**9**, IC₅₀ = 12.1 μmol/L). © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Pyrazinecarboxamides; Antimycobacterial; Antifungal; Photosynthesis inhibiting; Antialgal activity; Lipophilicity determination; Structure–activity relationships; *In vitro*

1. Introduction

Tuberculosis is still a major global disease infecting one third of the world's population and killing almost two million people each year. Multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in conjunction with the spread of HIV infection, often lead to the treatment failure. Thus, much effort is being made to develop novel anti-tuberculosis drugs which are more safe and efficacious [1]. There are two basic strategies for antimycobacterial drug development. The first is the extraordinary molecular diversity. The second results from

original compounds made more accessible by the design of new, or the modernisation of, synthetic transformations. The evaluation of pyrazinoic acid, the pharmacologically active principle of first line anti-tuberculosis drug pyrazinamide, is intensively focused on. The minimal structure of pyrazine ring with an acyl moiety is sufficient for fatty acid synthase type I (FAS I) and antimycobacterial activity of some pyrazinecarboxylic acid derivatives [2].

In connection with our research focused on antimycobacterial active pyrazinecarboxylic acid derivatives we are interested in binuclear analogues with the –CONH– bridge [3–5]. The amide function, as considered in this work, is based on the bivalent moiety –CONH–, which can form centrosymmetric dimer pairs with the peptidic carboxamido group of some peptides, needed for binding to the receptor

* Corresponding author. Tel.: +420495067389; fax: +420495067167.
E-mail address: dolezalm@faf.cuni.cz (M. Doležal).

Milford, MA, U.S.A.) in ca. 9×10^{-4} mol methanolic solution and $\log \epsilon$ (the logarithm of molar absorption coefficient ϵ) was calculated for the absolute maximum λ_{\max} of individual target compounds. Infrared spectra were recorded in Nicolet Impact 400 spectrometer in KBr pellets. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 (299.95 MHz for ^1H and 75.43 MHz for ^{13}C) and Varian (Palo Alto CA, U.S.A.) in CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$ solutions at ambient temperature. The chemical shifts δ are given in ppm related to tetramethylsilane (TMS) as internal standard. The coupling constants (J) are reported in Hz.

The purity of the final compounds was checked by HPLC, see Section 2.2. The detection wavelength 210 nm was chosen. Peaks in the chromatogram of the solvent (blank) were deducted from peaks in the chromatogram of the sample solution. The purity of the individual compounds was determined from area peaks in the chromatogram of the sample solution.

4.1.2. General procedure for pyrazinecarboxamide synthesis

A mixture of acid, *i.e.* pyrazine-2-carboxylic [15], 6-chloropyrazine-2-carboxylic [16], 5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic [3] or 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic [3] acids (50.0 mmol) and thionyl chloride (5.5 mL, 75.0 mmol) in dry toluene (20 mL) was refluxed for about 1 h. The excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with dry toluene *in vacuo*. The crude acyl chloride dissolved in dry acetone (50 mL) was added drop wise to a stirred solution of the corresponding substituted amine (50.0 mmol) in 50 mL of dry pyridine kept at room temperature. After the addition was complete, stirring was continued for another 30 min. The reaction mixture was then poured into 100 mL of cold water and the crude amide was collected and recrystallized from aqueous ethanol.

4.1.3. Data of prepared target compounds

4.1.3.1. *N*-(2-Chloro-5-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (1). Yield 47%. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}_2$ (249.5): 52.92% C, 3.23% H, 16.83% N. Found: 49.31% C, 3.85% H, 16.72% N. Mp 223–224 °C. HPLC purity 99.29%. $\log K$: 0.4527. $\log P$: 1.64 \pm 0.41. TLC: R_F = 0.78. UV (nm) $\lambda_{\max}/\log \epsilon$: 232.3/3.38. IR (KBr) cm^{-1} : 3348 (N–H), 1671 (C=O), 1593 (phenyl), 1529 (N–H), 1402, 1321, 1023 (pyrazine). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.27 (br s, 1H, NH), 9.93 (br s, 1H, OH), 9.32 (d, 1H, J = 1.40 Hz, H3), 8.97 (d, 1H, J = 2.50 Hz, H6), 8.83–8.81 (m, 1H, H5), 7.87 (d, 1H, J = 2.70 Hz, H6'), 7.32 (d, 1H, J = 8.80 Hz, H3'), 6.61 (dd, 1H, J = 8.80 Hz, J = 2.70 Hz, H4'). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 160.9, 157.1, 148.7, 144.0, 143.9, 143.6, 134.5, 130.0, 113.5, 113.2, 109.3.

4.1.3.2. *N*-(4-Fluorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (2). Yield 83%. Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FN}_3\text{O}$ (217.2): 60.83% C, 3.71% H, 19.35% N. Found: 60.40% C, 4.15% H, 19.45% N. Mp 154–155 °C. HPLC purity 99.21%. $\log K$: 0.4416. $\log P$:

1.58 \pm 0.46. TLC: R_F = 0.78. UV (nm) $\lambda_{\max}/\log \epsilon$: 221.7/3.48. IR (KBr) cm^{-1} : 3440 (N–H), 1665 (C=O), 1595 (phenyl), 1523 (N–H), 1409, 1318, 1027 (pyrazine). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.84 (1H, br s, NH), 9.29 (1H, d, J = 1.7 Hz, H3), 8.92 (1H, d, J = 2.5 Hz, H6), 8.80 (1H, dd, J = 2.5 Hz, J = 1.4 Hz, H5), 7.98–7.87 (2H, m, H2', H6'), and 7.26–7.15 (2H, m, H3', H5'). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 161.9, 158.8 (d, J = 240.8 Hz), 148.0, 145.2, 144.3, 143.4, 134.8 (d, J = 2.6 Hz), 122.7 (d, J = 7.8 Hz), and 115.5 (d, J = 22.0 Hz).

4.1.3.3. *N*-(2-Trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (3). Yield 71%. Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$ (267.2): 53.94% C, 3.02% H, 15.73% N. Found: 54.29% C, 3.05% H, 15.53% N. Mp 123 °C. HPLC purity 99.66%. $\log K$: 0.6911. $\log P$: 2.33 \pm 0.44. TLC: R_F = 0.77. UV (nm) $\lambda_{\max}/\log \epsilon$: 221.7/3.29. IR (KBr) cm^{-1} : 3370 (N–H), 1704 (C=O), 1593 (phenyl), 1457 (N–H), 1319, 1298, and 1112 (pyrazine). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 10.26 (1H, br s, NH), 9.52 (1H, d, J = 1.5 Hz, H3), 8.84 (1H, d, J = 2.5 Hz, H6), 8.64 (1H, dd, J = 2.5 Hz, J = 1.5 Hz, H5), 8.54 (1H, d, J = 7.4 Hz, H3'), 7.71–7.59 (2H, m, H5', H6'), and 7.33–7.24 (1H, m, H4'). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 161.0, 147.8, 144.7, 144.0, 142.7, 134.9, 133.0, 126.2 (q, J = 5.4 Hz), 124.6, 124.0 (q, J = 272.9 Hz), 123.2, and 120.0 (q, J = 29.7 Hz).

4.1.3.4. *N*-(3-Trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (4). Yield 61%. Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$ (267.2): 53.94% C, 3.02% H, 15.73% N. Found: 53.94% C, 2.93% H, 15.62% N. Mp 109 °C. HPLC purity 98.81%. $\log K$: 0.5585. $\log P$: 2.49 \pm 0.44. TLC: R_F = 0.69. UV (nm) $\lambda_{\max}/\log \epsilon$: 221.7/3.44. IR (KBr) cm^{-1} : 3327 (N–H), 1680 (C=O), 1593 (phenyl), 1450 (N–H), 1337, and 1126 (pyrazine). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.80 (1H, br s, NH), 9.52 (1H, d, J = 1.4 Hz, H3), 8.84 (1H, d, J = 2.5 Hz, H6), 8.61 (1H, dd, J = 2.5 Hz, J = 1.4 Hz, H5), 8.08–8.05 (1H, m, H2'), 8.00–7.94 (1H, m, H4'), 7.52 (1H, t, J = 8.0 Hz, H5'), and 7.46–7.40 (1H, m, H6'). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 160.9, 147.9, 144.7, 143.8, 142.4, 137.7, 131.6 (q, J = 32.7 Hz), 129.7, 123.8 (q, J = 272.6 Hz), 122.8, 121.3 (q, J = 4.0 Hz), and 116.5 (q, J = 4.1 Hz).

4.1.3.5. *N*-*p*-tolylpyrazine-2-carboxamide (5). Yield 44%. Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ (213.2): 67.59% C, 5.20% H, 19.71% N. Found: 67.34% C, 5.57% H, 19.55% N. Mp 148 °C. HPLC purity 99.56%. $\log K$: 0.4595. $\log P$: 1.60 \pm 0.40. TLC: R_F = 0.70. UV (nm) $\lambda_{\max}/\log \epsilon$: 218.2/3.47. IR (KBr) cm^{-1} : 3348 (N–H), 1671 (C=O), 1593 (phenyl), 1523 (N–H), 1402, 1321, and 1023 (pyrazine). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 9.61 (1H, br s, NH), 9.51 (1H, d, J = 1.5 Hz, H3), 8.79 (1H, d, J = 2.5 Hz, H6), 8.58 (1H, dd, J = 2.5 Hz, J = 1.5 Hz, H5), 7.68–7.60 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24–7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), and 2.35 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 160.4, 147.4, 144.6, 144.5, 142.3, 134.6, 134.5, 129.6, 119.7, and 20.9.

4.1.3.6. 6-Chloro-*N*-(2-chloro-5-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**6**). Yield 58%. Anal. Calcd for C₁₁H₇Cl₂N₃O₂ (284.1): 46.51% C, 2.48% H, 14.79% N. Found: 46.16% C, 3.42% H, 14.705% N. Mp 255 °C. HPLC purity 98.72%. log *K*: 0.7801. log *P*: 2.76 ± 0.43. TLC: *R*_F = 0.72. UV (nm) λ_{max}/log ε: 233.5/3.37. IR (KBr) cm⁻¹: 3365 (N–H), 1700 (C=O), 1593 (phenyl), 1528 (N–H), 1350, 1290, 1108 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.10 (1H, br s, NH), 9.93 (1H, br s, OH), 9.26 (1H, s, H3), 9.11 (1H, s, H5), 7.71 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H6'), 7.33 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H3'), and 6.64 (1H, dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.8 Hz, H4'). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 159.9, 157.1, 148.3, 147.0, 143.9, 142.2, 134.4, 130.0, 114.4, 113.7, and 110.2.

4.1.3.7. 6-Chloro-*N*-(4-fluorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**7**). Yield 59%. Anal. Calcd for C₁₁H₇ClFN₃O (251.7): 52.50% C, 2.80% H, 16.70% N. Found: 52.40% C, 3.205% H, 17.07% N. Mp 131–132 °C. HPLC purity 98.03%. log *K*: 0.7557. log *P*: 2.70 ± 0.48. TLC: *R*_F = 0.82. UV (nm) λ_{max}/log ε: 229.9/3.49. IR (KBr) cm⁻¹: 3375 (N–H), 1710 (C=O), 1594 (phenyl), 1533 (N–H), 1351, 1302, 1119 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.74 (1H, br s, NH), 9.22 (1H, d, *J* = 0.6 Hz, H3), 9.05 (1H, s, H5), 7.93–7.83 (2H, m, H2', H6'), and 7.27–7.17 (2H, m, H3', H5'). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 160.8, 159.0 (d, *J* = 241.0 Hz), 147.7, 147.1, 145.3, 142.6, 134.5 (d, *J* = 2.6 Hz), 123.0 (d, *J* = 8.1 Hz), and 115.5 (d, *J* = 22.3 Hz).

4.1.3.8. 6-Chloro-*N*-(2-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**8**). Yield 47%. Anal. Calcd for C₁₂H₇ClF₃N₃O (301.7): 47.78% C, 2.34% H, 13.93% N. Found: 47.44% C, 2.31% H, 13.65% N. Mp 148–150 °C. HPLC purity 99.69%. log *K*: 0.8602. log *P*: 3.45 ± 0.46. TLC: *R*_F = 0.84. UV (nm) λ_{max}/log ε: 220.5/3.26. IR (KBr) cm⁻¹: 3384 (N–H), 1707 (C=O), 1594 (phenyl), 1543 (N–H), 1322, 1301, and 1109 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.98 (1H, br s, NH), 9.39 (1H, d, *J* = 0.6 Hz, H3), 8.84 (1H, d, *J* = 0.6 Hz, H5), 8.46 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H3'), 7.73–7.59 (2H, m, H5', H6'), and 7.35–7.27 (1H, m, H4'). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 160.6, 159.8, 147.9, 147.7, 143.5, 142.1, 133.0, 126.3 (q, *J* = 5.2 Hz), 125.0, 123.9 (q, *J* = 272.9 Hz), 123.5 and 120.4 (q, *J* = 32.7 Hz).

4.1.3.9. 6-Chloro-*N*-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**9**). Yield 62%. Anal. Calcd for C₁₂H₇ClF₃N₃O (301.7): 47.78% C, 2.34% H, 13.93% N. Found: 48.09% C, 2.72% H, 13.97% N. Mp 109 °C. HPLC purity 98.71%. log *K*: 0.8362. log *P*: 3.61 ± 0.47. TLC: *R*_F = 0.80. UV (nm) λ_{max}/log ε: 219.8/3.35. IR (KBr) cm⁻¹: 3351 (N–H), 1680 (C=O), 1603 (phenyl), 1545 (N–H), 1330, 1169, and 1131 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.52 (1H, br s, NH), 9.40 (1H, s, H3), 8.84 (1H, s, H5), 8.07 (1H, br s, H2'), 7.99–7.94 (1H, m, H4'), 7.58–7.49 (1H, m, H5'), and 7.49–7.42 (1H, m, H6'). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 159.6, 147.9, 147.5, 143.4, 142.3, 137.4, 131.6 (q, *J* = 32.7 Hz), 129.8, 123.7 (q, *J* = 272.6 Hz), 123.0, 121.7 (q, *J* = 3.7 Hz), and 116.7 (q, *J* = 4.0 Hz).

4.1.3.10. 6-Chloro-*N*-*p*-tolylpyrazine-2-carboxamide (**10**). Yield 59%. Anal. Calcd for C₁₂H₁₀ClN₃O (247.7): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N. Found: 58.11% C, 4.45% H, 16.32% N. Mp 134 °C. HPLC purity 99.39%. log *K*: 0.7627. log *P*: 2.72 ± 0.41. TLC: *R*_F = 0.81. UV (nm) λ_{max}/log ε: 222.7/3.37. IR (KBr) cm⁻¹: 3370 (N–H), 1694 (C=O), 1592 (phenyl), 1531 (N–H), 1320, 1168, and 1144 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.39 (1H, d, *J* = 0.5 Hz, H3), 9.34 (1H, br s, NH), 8.79 (1H, s, H5), 7.67–7.59 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.24–7.17 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), and 2.35 (3H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 159.2, 147.4, 144.1, 142.2, 134.9, 134.3, 129.7, 119.9, and 20.9.

4.1.3.11. 5-*tert*-Butyl-*N*-(2-chloro-5-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**11**). Yield 35%. Anal. Calcd for C₁₅H₁₆ClN₃O₂ (305.8): 58.92% C, 5.27% H, 13.74% N. Found: 58.39% C, 6.335% H, 13.83% N. Mp 239–240 °C. HPLC purity 99.34%. log *K*: 1.0654. log *P*: 3.33 ± 0.42. TLC: *R*_F = 0.87. UV (nm) λ_{max}/log ε: 225.2/3.29. IR (KBr) cm⁻¹: 3376 (N–H), 2992, 2960, 2926, 2915 (*tert*-butyl), 1690 (C=O), 1595 (phenyl), 1528 (N–H), 1320, 1250, 11320 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.24 (1H, br s, NH), 9.93 (1H, br s, OH), 9.23 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H3), 8.93 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H6), 7.92 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H6'), 7.32 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H3'), 6.60 (1H, dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.9 Hz, H4'), and 1.39 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 167.8, 160.9, 157.2, 142.3, 141.2, 140.5, 134.6, 129.9, 113.1, 113.0, 108.9, 37.1, and 29.6.

4.1.3.12. 5-*tert*-Butyl-*N*-(4-fluorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**12**). Yield 47%. Anal. Calcd for C₁₁H₁₀FN₃O (273.3): 65.92% C, 5.90% H, 15.37% N. Found: 64.92% C, 6.405% H, 15.525% N. Mp 178 °C. HPLC purity 99.58%. log *K*: 0.9928. log *P*: 3.27 ± 0.47. TLC: *R*_F = 0.84. UV (nm) λ_{max}/log ε: 222.9/3.34. IR (KBr) cm⁻¹: 3361 (N–H), 2984, 2961, 2920, 2906 (*tert*-butyl), 1680 (C=O), 1591 (phenyl), 1522 (N–H), 1318, 1150 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.45 (1H, br s, NH), 9.19 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H3), 8.84 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H6), 7.96–7.86 (2H, m, H2', H6'), 7.25–7.15 (2H, m, H3', H5'), and 1.39 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 166.9, 162.0, 158.7 (d, *J* = 240.8 Hz), 142.6, 142.6, 139.9, 134.9 (d, *J* = 2.6 Hz), 122.6 (d, *J* = 8.0 Hz), 115.5 (d, *J* = 22.3 Hz), 37.0, and 29.6.

4.1.3.13. 5-*tert*-Butyl-*N*-(2-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**13**). Yield 47%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₆F₃N₃O (323.3): 59.44% C, 4.99% H, 13.00% N. Found: 59.47% C, 5.10% H, 13.05% N. Mp 82.5 °C. HPLC purity 99.89%. log *K*: 1.2622. log *P*: 4.02 ± 0.46. TLC: *R*_F = 0.88. UV (nm) λ_{max}/log ε: 224.0/3.27. IR (KBr) cm⁻¹: 3356 (N–H), 2961, 2907, 2869 (*tert*-butyl), 1698 (C=O), 1593 (phenyl), 1539 (NH), 1322, 1171, and 1118 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 10.27 (1H, br s, NH), 9.40 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H3), 8.70 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H6), 8.57 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H3'), 7.70–7.58 (2H, m, H5', H6'), 7.31–7.22

(1H, m, H4'), and 1.45 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 168.1, 161.5, 143.1, 141.0, 139.4, 135.1, 133.0, 126.2 (q, *J* = 5.2 Hz), 124.3, 124.1 (q, *J* = 272.8 Hz), 123.1, 119.8 (q, *J* = 29.7 Hz), 37.1, and 29.7.

4.1.3.14. *5-tert-Butyl-N-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (14)*. Yield 38%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₆F₃N₃O (323.3): 59.44% C, 4.99% H, 13.00% N. Found: 59.83% C, 5.09% H, 13.17% N. Mp 84.5 °C. HPLC purity 99.81%. log *K*: 1.1338. log *P*: 4.18 ± 0.46. TLC: *R*_F = 0.86. UV (nm) λ_{max}/log ε: 217.0/3.35. IR (KBr) cm⁻¹: 3350 (N–H), 2974, 2938, 2911, 2874 (*tert*-butyl), 1684 (C=O), 1604 (phenyl), 1543 (N–H), 1339, and 1133 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.78 (1H, br s, NH), 9.40 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H3), 8.63 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H6), 8.08 (1H, br s, H2'), 7.98–7.92 (1H, m, H4'), 7.51 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H5'), 7.44–7.39 (1H, m, H6'), and 1.45 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 168.2, 161.4, 143.1, 140.9, 139.1, 138.0, 131.6 (q, *J* = 32.4 Hz), 129.7, 123.8 (q, *J* = 272.6 Hz), 122.7, 121.1 (q, *J* = 4.0 Hz), 116.4 (q, *J* = 4.0 Hz), 37.1, and 29.7.

4.1.3.15. *5-tert-Butyl-N-p-tolylpyrazine-2-carboxamide (15)*. Yield 83%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₉N₃O (269.4): 71.35% C, 7.11% H, 15.60% N. Found: 71.58% C, 7.38% H, 15.62% N. Mp 143 °C. HPLC purity 99.08%. log *K*: 1.0222. log *P*: 3.28 ± 0.40. TLC: *R*_F = 0.86. UV (nm) λ_{max}/log ε: 222.9/3.38. IR (KBr) cm⁻¹: 3351 (N–H), 2977, 2957, 2922, 2906, 2872 (*tert*-butyl, methyl), 1676 (C=O), 1592 (phenyl), 1520 (NH), 1314, and 1147 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.60 (1H, br s, NH), 9.39 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H3), 8.61 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H6), 7.68–7.61 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23–7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.35 (3H, s, CH₃), and 1.44 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 167.6, 160.9, 142.9, 141.5, 138.9, 134.9, 134.2, 129.6, 119.7, 37.0, 29.7, and 20.9.

4.1.3.16. *5-tert-Butyl-6-chloro-N-(2-chloro-5-hydroxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (16)*. Yield 69%. Anal. Calcd for C₁₅H₁₅Cl₂N₃O₂ (340.2): 52.96 % C, 4.44% H, 12.35% N. Found: 52.525% C, 5.765% H, 12.12% N. Mp 253 °C. HPLC purity 99.29%. log *K*: 1.4335. log *P*: 4.45 ± 0.44. TLC: *R*_F = 0.92. UV (nm) λ_{max}/log ε: 227.6/3.28. IR (KBr) cm⁻¹: 3386 (N–H), 2990, 2960, 2939 (*tert*-butyl), 1705 (C=O), 1591 (phenyl), 1529 (N–H), 1340, 1260, 1049 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.03 (1H, br s, NH), 9.93 (1H, br s, OH), 9.16 (1H, s, H3), 7.76 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H6'), 7.33 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H3'), 6.63 (1H, dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.8 Hz, H4'), and 1.50 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 163.8, 159.9, 157.1, 145.3, 141.4, 140.3, 134.4, 130.0, 114.0, 113.5, 109.8, 38.8, and 28.2.

4.1.3.17. *5-tert-Butyl-6-chloro-N-(4-fluorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (17)*. Yield 61%. Anal. Calcd for C₁₅H₁₅ClFN₃O (307.8): 58.54% C, 4.91% H, 13.65% N. Found: 58.265% C, 5.40% H, 13.98% N. Mp 171–172 °C. HPLC purity 99.53%. log *K*: 1.3488. log *P*: 4.39 ± 0.49. TLC: *R*_F = 0.93.

UV (nm) λ_{max}/log ε: 228.7/3.33. IR (KBr) cm⁻¹: 3370 (N–H), 2978, 2956, 2929 (*tert*-butyl), 1700 (C=O), 1594 (phenyl), 1532 (N–H), 1327, 1262, 1148 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ: 10.62 (1H, br s, NH), 9.12 (1H, s, H3), 7.91–7.81 (2H, m, H2', H6'), 7.26–7.16 (2H, m, H3', H5'), and 1.50 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ: 163.0, 160.9, 158.9 (d, *J* = 241.4 Hz), 145.4, 142.8, 140.6, 134.6 (d, *J* = 2.6 Hz), 122.9 (d, *J* = 8.0 Hz), 115.5 (d, *J* = 22.3 Hz), 38.7, and 28.2.

4.1.3.18. *5-tert-Butyl-6-chloro-N-(2-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (18)*. Yield 26%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₅ClF₃N₃O (357.8): 53.72% C, 4.23% H, 11.75% N. Found: 54.06% C, 3.89% H, 11.82% N. Mp 81 °C. HPLC purity 99.75%. log *K*: 1.6560. log *P*: 5.14 ± 0.48. TLC: *R*_F = 0.89. UV (nm) λ_{max}/log ε: 229.9/3.26. IR (KBr) cm⁻¹: 3366 (N–H), 2980, 2961, 2936, 2909, 2874 (*tert*-butyl, trifluoromethyl), 1715 (C=O), 1592 (phenyl), 1532 (N–H), 1323, 1290, and 1120 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.99 (1H, br s, NH), 9.26 (1H, s, H3), 8.49 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H3'), 7.72–7.57 (2H, m, H5', H6'), 7.33–7.24 (1H, m, H4'), and 1.56 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 165.0, 160.2, 146.0, 140.6, 140.2, 134.7, 133.0, 126.3 (q, *J* = 5.2 Hz), 124.7, 124.0 (q, *J* = 272.9 Hz), 123.3, 120.2 (q, *J* = 30.0 Hz), 39.1, and 28.2.

4.1.3.19. *5-tert-Butyl-6-chloro-N-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (19)*. Yield 21%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₅ClF₃N₃O (357.8): 53.72% C, 4.23% H, 11.75% N. Found: 53.49% C, 4.60% H, 12.03% N. Mp 71.8 °C. HPLC purity 98.37%. log *K*: 1.5271. log *P*: 5.30 ± 0.48. TLC: *R*_F = 0.84. UV (nm) λ_{max}/log ε: 232.3/3.28. IR (KBr) cm⁻¹: 3375 (N–H), 2985, 2960, 2940, 2910, 2870 (*tert*-butyl, trifluoromethyl), 1720 (C=O), 1603 (phenyl), 1530 (N–H), 1325, 1250, and 1158 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.99 (1H, br s, NH), 9.04 (1H, s, H3), 8.63 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H6), 8.08 (1H, br s, H2'), 7.98–7.92 (1H, m, H4'), 7.51 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H5'), 7.44–7.39 (1H, m, H6'), 1.34 (9H, s and CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 168.2, 161.4, 144.9, 140.9, 139.1, 138.5, 131.6 (q, *J* = 32.4 Hz), 129.7, 123.8 (q, *J* = 272.6 Hz), 122.7, 120.9 (q, *J* = 4.0 Hz), 119.4 (q, *J* = 4.0 Hz), 37.1, 31.0, and 29.7.

4.1.3.20. *5-tert-Butyl-6-chloro-N-p-tolylpyrazine-2-carboxamide (20)*. Yield 31%. Anal. Calcd for C₁₆H₁₈ClN₃O (303.8): 63.26% C, 5.97% H, 13.83% N. Found: 63.17% C, 5.87% H, 13.69% N. Mp 162 °C. HPLC purity 99.18%. log *K*: 1.3205. log *P*: 4.41 ± 0.42. TLC: *R*_F = 0.83. UV (nm) λ_{max}/log ε: 227.9/3.39. IR (KBr) cm⁻¹: 3376 (N–H), 2978, 2956, 2929, 2867 (*tert*-butyl, methyl), 1701 (C=O), 1596 (phenyl), 1538 (N–H), 1317, 1260, and 1148 (pyrazine). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.31 (1H, br s, NH), 9.26 (1H, s, H3), 7.67–7.60 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23–7.16 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.35 (3H, s, CH₃), and 1.55 (9H, s, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 164.4, 159.6, 141.2, 140.2, 134.6, 134.5, 129.6, 119.9, 38.9, 28.3, and 20.9.

4.2. Lipophilicity HPLC determination (capacity factor K /calculated $\log K$)

The HPLC separation module Waters Alliance 2695 XE and Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.) were used. The chromatographic column Symmetry[®] C₁₈ 5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Part No. WAT054275 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.) was used. The HPLC separation process was monitored by Millennium32[®] Chromatography Manager Software, Waters 2004 (Waters Corp., Milford, MA, U.S.A.). The mixture of MeOH p.a. (70.0%) and H₂O-HPLC–Mili-Q Grade (30.0%) was used as a mobile phase. The total flow of the column was 1.0 mL/min, injection 30 μ L, column temperature 30 °C and sample temperature 10 °C. The detection wavelength 210 nm was chosen. The KI methanolic solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) were measured in minutes.

The capacity factors K were calculated using the Millennium32[®] Chromatography Manager Software according to the formula $K = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute, whereas T_D denotes the dead time obtained via an unretained analyte. $\log K$, calculated from the capacity factor K , is used as the lipophilicity index converted to $\log P$ scale. The $\log K$ values of the individual compounds are summarized in Table 1 and Section 4.1.3.

4.3. Lipophilicity calculations

$\log P$, i.e. the logarithm of the partition coefficient P for n -octanol/water, was calculated using the commercially available program ACD/log P version 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). The results are summarized in Table 1 and Section 4.1.3.

4.4. Biological methods

4.4.1. Antimycobacterial assay

Antimycobacterial evaluation was carried out in the tuberculosis antimicrobial acquisition and coordinating facility (TAACF), Southern Research Institute, Birmingham, AL, U.S.A., which is a part of the National Institutes of Health (NIH). Primary screening of all compounds was conducted at 6.25 μ g/mL against *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC27294) in BACTEC 12B medium using both BACTEC 460 radiometric system and the Microplate Almar Blue Assay (MABA). Compounds demonstrating at least 90% inhibition in the primary screen were tested at lower concentration against *M. tuberculosis* H₃₇Rv to determine the MIC testing by MABA. The MIC is defined as the lowest concentration effecting a reduction in fluorescence of 90% relative to controls. Concurrent with the determination of MICs, the compounds were tested for their cytotoxicity (determination of 50% inhibitory concentrations, IC₅₀) in VERO cells at concentrations less than or equal to 62.5 μ g/ml or 10 times the MIC for *M. tuberculosis* H₃₇Rv. After 72 h exposure, viability is assessed on the basis of cellular conversion of MTT into a formazan product using

the Promega CellTiter 96 Non-radioactive Cell Proliferation Assay. At the conclusion of secondary screening, the MIC and IC₅₀ values are formed into a ratio termed selectivity index (SI). At an SI level of 10 or greater, a compound is considered active at the second level [18,19]. The results are presented in Tables 1 and 2.

4.4.2. In vitro antifungal susceptibility testing

The broth microdilution test [10,22] was used for the assessment of *in vitro* antifungal activity of the synthesized compounds against *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 201 (CG), *Trichosporon asahii* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC), and *T. mentagrophytes* 445 (TM). Fluconazole was used as a reference drug. The procedure was performed with twofold dilution of the compounds in RPMI 1640 medium (Sevapharma, Prague, Czech Republic) buffered to pH 7.0 with 0.165 mol of 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid. The final concentrations of the compounds ranged from 0.975 μ mol/L to 500 μ mol/L. Drug-free controls were included. The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined after 24 h and 48 h of static incubation at 35 °C. With *T. mentagrophytes*, the final MICs were determined after 72 h and 120 h of incubation. The results of all compounds *in vitro* tested against *T. mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain, are summarized in Table 1.

4.4.3. Herbicidal activities

4.4.3.1. Study of inhibition of oxygen evolution rate in spinach chloroplasts.

Chloroplasts were prepared by the procedure of Walker from spinach (*Spinacia oleracea* L.) [23]. The inhibition of photosynthetic electron transport (PET) in spinach chloroplasts was determined spectrophotometrically (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) using an artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCIPP) according to Kralova et al. [24] and the rate of photosynthetic electron transport was monitored as a photoreduction of DCPIP. The measurements were carried out in phosphate buffer (0.02 mol/L, pH 7.2) containing sucrose (0.4 mol/L), MgCl₂ (0.005 mol/L) and NaCl (0.015 mol/L). The chlorophyll content was 30 mg/L in these experiments and the samples were irradiated (~ 100 W/m²) from a 10-cm distance with a halogen lamp (250 W) using a 4-cm water filter to prevent warming of the samples (suspension temperature 22 °C). The studied compounds were dissolved in DMSO due to their limited water solubility. The applied DMSO concentration (up to 4%) did not affect the photochemical activity in spinach chloroplasts (PET). The inhibitory efficiency (concentration) of the studied compounds has been expressed by IC₅₀ values, i.e. by molar concentration of the compounds causing 50% decrease in the oxygen evolution relative to the untreated control. The comparable IC₅₀ value for a selective herbicide 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (diurone, DCMU) was about 1.9 μ mol/L [25]. The results are summarized in Table 1.

4.4.3.2. Reduction of chlorophyll content in the green algae *C. vulgaris* Beij. The green algae *C. vulgaris* Beij. were cultivated statically at room temperature according to Kralova et al. [26] (photoperiod 16 h light/8 h dark; photosynthetic active radiation 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$, pH 7.2). The effect of the compounds on algal chlorophyll (Chl) content was determined after seven-day cultivation in the presence of the tested compounds. The Chl content in the algal suspension was determined spectrophotometrically (Kontron Uvikon 800, Kontron, Munchen, Germany) after extraction into methanol according to Wellburn [27]. The Chl content in the suspensions at the beginning of the cultivation was 0.01 mg/L. The applied compound concentrations were as follows: 0.83 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 4.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 8.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 25 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 75 $\mu\text{mol}/\text{L}$, and 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$. Because of the low solubility of the studied compounds in water, these were dissolved in DMSO. DMSO concentration in the algal suspensions did not exceed 0.25% and the control samples contained the same DMSO amount as the suspensions treated with the tested compounds. The antialgal activity of the compounds was expressed as IC_{50} (the concentration of the inhibitor causing a 50% decrease in content of chlorophyll as compared with the control sample) or as percentage of the control determined for the studied concentration range (0.83–100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) with the corresponding standard deviation (S.D.). The comparable IC_{50} value for a selective herbicide DCMU was about 7.3 $\mu\text{mol}/\text{L}$ [23]. The results are summarized in Table 1.

Acknowledgments

This study was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM0021620822), and by the Slovak Scientific Grant Agency VEGA (No. 1/0089/03). Antimycobacterial data were provided by the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF) through a research and development contract with the U.S. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

References

- [1] P. Nunn, B. Williams, K. Floyd, Ch. Dye, G. Elzinga, M. Raviglione, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 819.
- [2] O. Zimhony, C. Vilcheze, M. Arai, J.T. Welch, W.R. Jacobs Jr., *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 752.
- [3] K. Dlabal, M. Dolezal, M. Machacek, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 58 (1993) 452.
- [4] M. Dolezal, J. Hartl, M. Miletin, M. Machacek, K. Kralova, *Chem. Pap.* 53 (1999) 126.
- [5] M. Dolezal, L. Palek, J. Vinsova, V. Buchta, J. Jampilek, K. Kralova, *Molecules* 11 (2006) 242.
- [6] N.E. Good, *Plant. Physiol.* 36 (1961) 788.
- [7] K. Kralova, F. Sersen, J. Cizmarik, *Chem. Pap.* 46 (1992) 266.
- [8] K. Kralova, F. Sersen, M. Miletin, J. Hartl, *Chem. Pap.* 52 (1998) 52.
- [9] L. Kubicova, M. Sustr, K. Kralova, V. Chobot, J. Vytlacilova, L. Jahodar, P. Vuorela, M. Machacek, J. Kaustova, *Molecules* 8 (2003) 756.
- [10] M. Dolezal, J. Jampilek, Z. Osicka, J. Kunes, V. Buchta, P. Vichova, *Farmaco* 58 (2003) 1105.
- [11] M. Dolezal, J. Hartl, M. Miletin, *Folia Pharm. Univ. Carol.* 25 (2000) 15.
- [12] L. Tumova, K. Gallova, J. Rimakova, M. Dolezal, J. Tuma, *Acta Physiol. Plant.* 27 (2005) 357.
- [13] R. Musiol, J. Jampilek, V. Buchta, L. Silva, H. Niedbala, B. Podeszwa, A. Palka, K. Majerz-Maniecka, B. Oleksyn, J. Polanski, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3592.
- [14] J. Vinsova, K. Cermakova, A. Tomeckova, M. Ceckova, V. Buchta, J. Jampilek, P. Cermak, J. Kunes, M. Dolezal, F. Staud, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 5850.
- [15] H. Foks, J. Sawlewicz, *Acta Polon. Pharm.* 21 (1964) 429.
- [16] Y. Abe, Y. Shigetani, F. Uchimaru, S. Okada, E. Ozasayama, *Japan Patent* 69 12,898, 1969. *Chem. Abstr.* 71 (1969) 112979y.
- [17] P.M. López-Roldán, J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 599.
- [18] <http://www.taacf.org/about-TAACF.htm> (13 February 2007).
- [19] L. Collins, S.G. Franzblau, *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1004.
- [20] F.E. Norrington, R.M. Hyde, G.G. Williams, R. Wooton, *J. Med. Chem.* 18 (1975) 604.
- [21] C. Hansch, A.J. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1979, pp. 1–379.
- [22] National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standard*, NCCLS Document, M27-A, NCCLS, Villanova, PA, U.S.A., 1997.
- [23] D.A. Walker, in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology Part C*, Vol. 69, Academic Press, New York, 1980, pp. 94–104.
- [24] K. Kralova, F. Sersen, E. Sidoova, *Chem. Pap.* 46 (1992) 348.
- [25] C. Fedke, *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*, Springer Verlag, Berlin–Heidelberg–New York, 1982.
- [26] K. Kralova, F. Sersen, M. Melnik, *J. Trace Microprobe Tech.* 16 (1998) 491.
- [27] A.R. Wellburn, *J. Plant. Physiol.* 144 (1994) 307.

9 Souhrn v českém jazyce

Autor této práce se v rámci svého doktorského studia podílel na dlouhodobě řešeném tématu při FaF UK v Hradci Králové, který se zabývá hledáním nových potenciálních léčiv proti tuberkulóze. Zvoleným přístupem k řešení tohoto tématu je syntéza analog pyrazinamidu, léčiva první volby terapie TBC, což je linie výzkumu započatá na přelomu 80. a 90. let minulého století na KFCHKL doc. Jiřím Hartlem, CSc., na kterou navázal doc. Martin Doležal, Ph.D. Za celou dobu bylo připraveno přes 800 analogů zmíněného léčiva.

V této práci je rozebrán vztah chemické struktury a biologické aktivity následujících strukturních analogií pyrazinamidu. Jedná se o deriváty arylsulfanylpyrazin-2-karboxamid, arylsulfanylpyrazin-2-karbonitril, N-aryl nebo N-thiazolylpyrazin-2-karboxamid a arylaminopyrazin-2,5-dikarbonitril.

Prvním krokem studie a cílem práce autora je syntéza zmíněných analogických struktur. Tyto látky byly následně strukturně analyzovány a jako takové byly postoupeny spolupracujícím stranám pro biologickou analýzu. Ta zahrnovala především antimykobakteriální aktivitu a vzhledem k faktu, že některá antimykobakteriálně účinná léčiva jsou aktivní i jako antifungální látky, byla sledována i aktivita antifungální. Vzhledem k tomu, že připravené látky absorbovaly ve viditelné oblasti elektromagnetického vlnění, byly poskytnuty pro studium jejich potence na inhibici fotosyntézy.

Některé struktury vykazaly velmi solidní antimykobakteriální aktivitu. Jedná se především o *N*-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid, *N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid a 3-{{[3-(trifluormethyl)-fenyl]amino}pyrazin-2,5-dikarbonitril, které vykazaly aktivitu s hodnotou MIC v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tyto látky byly v rámci screeningu TAACF propuštěny do úrovně 2 hodnocení, kdy byla stanovena toxicita, přesná MIC a vypočten index selektivity těchto látek. Jedna z nich má úspěšný výsledek i v této oblasti a je dále studována.

Z publikovaných výsledků je dobře patrná souvislost mezi strukturou a biologickou aktivitou připravených látek a je naděje, že výběrem dobré látky pro strukturní optimalizaci je možno dojít k velmi nadějně struktuře.

Antifungální aktivita byla stanovena jako slabá až střední a z připravené knihovny derivátů proto nelze racionálně posuzovat souvislosti mezi strukturou a účinkem. Inhibice fotosyntézy byla sledována jako okrajový parametr, nicméně některé z látek vykazaly v tomto směru zajímavou aktivitu.

10 Souhrn v anglickém jazyce

Author participated during his doctoral thesis on theme with long history in Pharmaceutical Faculty research program, which is search for new antimycobacterial active compounds. An approach that had been chosen to develop such compounds is structure analogy of pyrazinamide, first-line agent in treatment of tuberculosis. This pathway have been set up in late 80's and early 90's of last century by doc. Jiří Hartl, CSc. and followed by doc. Martin Doležal, Ph.D. until nowadays. In summary there was prepared over 800 compounds that were screened on their antimycobacterial activity.

This thesis deals with structure-activity relationships of some pyrazinamide analogues rather structures derived from arylsulphonylpyrazine-2-carboxamide, arylsulphonylpyrazine-2-carbonitrile, *N*-aryl or *N*-thiazolylpyrazine-2-carboxamide, arylaminopyrazine-2,5-dicarbonitrile respectively.

The first step of the whole study was chemical synthesis of new analogues which was done by the author of this thesis. Chemical synthesis was followed by structure elucidation and lipophilicity determination. After synthetic and analytical part were completed, biological evaluation begun. Biological analysis comprised antimycobacterial activity screening as a main task. Current knowledge that some antimycobacterials are active antifungals as well gave good reason to evaluate even antifungal activity. Lastly, because all prepared compounds absorbed in the visible range of electromagnetic spectrum some of them were evaluated for their potential photosynthetic inhibitory activity.

Some of prepared compounds exhibited relatively high antimycobacterial activity, namely *N*-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-pyrazine-2-carboxamide, *N*-(3-trifluoromethylphenyl)pyrazine-2-carboxamide and 3-{[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino}pyrazine-2,5-dicarbonitrile respectively. These structures exhibited activity units of $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. These compounds were released to higher levels of TAACF antimycobacterial screening. In these levels the nitrilic compound exhibited unacceptable toxicity but one of amidic compounds showed good selectivity index and is evaluated further. Published results give good view onto structure-activity relationships of these analogues and promise even better activity after some structure optimization experiments.

In case of activity only poor or moderate activities were found thus no relevant conclusions on structure activity relationships can be done. Inhibition of photosynthetic activity was an additional experiment, because prepared compounds of were. On the other hand, some of them exhibited good photosynthesis inhibiting activity.

11 Seznam použité literatury

1. Herzog, H. History of tuberculosis. *Respiration* **1998**, 65, 5-15.
2. William O. Foye, e. a. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. sixth edition ed.; Wolters Kluwer Health: 2007.
3. Leung, A. N. Pulmonary Tuberculosis: The Essentials. *Radiology* **1999**, 210, 307-322.
4. WHO. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008. 2008.
5. WHO. *Tuberculosis facts*; WHO: Geneve, 2008; p 2.
6. Nunn, P.; Reid, A.; De Cock, K. M. Tuberculosis and HIV Infection: The Global Setting. *JID* **2007**, 196, S5-S14.
7. Dye, C.; Espinal, Marcos A.; Watt, Catherine J.; Mbiaga, C.; Williams, Brian G. Worldwide Incidence of Multidrug Resistant Tuberculosis. *JID* **2002**, 185, 1197-1202.
8. WHO. Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World, Fourth Global Report. WHO: 2008; p 112.
9. WHO. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO: 2008; p 247.
10. WHO. XDR-TB - The facts - November 2007. WHO: 2007; p 2.
11. WHO. What is DOTS? A Guide to Understanding the WHO-recommended TB Control Strategy Known as DOTS; WHO: Geneve, 1999.
12. In *Ministerial Conference*, Amsterdam, Netherlands, 2000; Amsterdam, Netherlands, 2000.
13. O'Brien, R.; Nunn, P. The Need for New Drugs against Tuberculosis . Obstacles, Opportunities, and Next Steps. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, 163, 1055-1058.
14. Tuberculosis. Scientific blueprint for tuberculosis drug development. *Tuberculosis (Edinb)* **2001**, 81 Suppl 1, 1-52.
15. Spigelman, M. K. New Tuberculosis Therapeutics: A Growing Pipeline. *JID* **2007**, 196, S28-S34.
16. Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.;

Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**, 393, 537-544.

17. P. E. Kolattukudy, N. D. F., A. K. Azad, Ann Marie Fitzmaurice, Tatiana D. Sirakova,. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* **1997**, 24, 263-270.

18. Wheeler, P. R.; Ratledge, C. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. ASM press: Washington DC, 1994; p 654.

19. Cole, S. T.; Telenti, A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J Suppl* **1995**, 20, 701s-713s.

20. Mdluli, K.; Slayden, R. A.; Zhu, Y.; Ramaswamy, S.; Pan, X.; Mead, D.; Crane, D. D.; Musser, J. M.; Barry, C. E., III. Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* {beta}-Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science* **1998**, 280, 1607-1610.

21. Collins, D. M. In search of tuberculosis virulence genes. *Trends Microbiol* **1996**, 4, 426-430.

22. Gonzalo-Asensio, J.; Mostowy, S.; Harders-Westerveen, J.; Huygen, K.; Hernandez-Pando, R.; Thole, J.; Behr, M.; Gicquel, B.; Martin, C. PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS ONE* **2008**, 3, 3496.

23. Goude, R.; Parish, T. The genetics of cell wall biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol* **2008**, 3, 299-313.

24. Ramesh, K. V.; Wagle, K.; Deshmukh, S. Domain analysis of fatty acid synthase protein (NP_217040) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv--a bioinformatics study. *J Biomol Struct Dyn* **2007**, 24, 393-412.

25. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, 167, 603-662.

26. WHO. An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control; World Health Organisation: Geneve, 2002.
27. Donald A Enarson, H. L. R., Thuridur Arnadottir, Arnaud Trébucq. *Management of Tuberculosis: a Guide for Low Income Countries, 2000, 5th ed*; International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: Paris, 2000.
28. Wells, C. D.; Cegielski, J. P.; Nelson, L. J.; Laserson, K. F.; Holtz, T. H.; Finlay, A.; Castro, K. G.; Weyer, K. HIV Infection and Multidrug-Resistant Tuberculosis: The Perfect Storm. *JID* **2007**, 196, S86-S107.
29. Isoniazid. *Tuberculosis* **2008**, 88, 112-116.
30. Rifampin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 151-154.
31. Ethambutol. *Tuberculosis* **2008**, 88, 102-105.
32. Pyrazinamide. *Tuberculosis* **2008**, 88, 141-144.
33. Rifabutin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 145-147.
34. Kanamycin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 117-118.
35. Amikacin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 87-88.
36. Capreomycin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 89-91.
37. Streptomycin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 162-163.
38. Ethionamide. *Tuberculosis* **2008**, 88, 106-108.
39. Prothionamide. *Tuberculosis* **2008**, 88, 139-140.
40. Cycloserine. *Tuberculosis* **2008**, 88, 100-101.
41. Para-aminosalicylic acid. *Tuberculosis* **2008**, 88, 137-138.
42. Levofloxacin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 119-121.
43. Moxifloxacin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 127-131.
44. Clofazimine. *Tuberculosis* **2008**, 88, 96-99.
45. Linezolid. *Tuberculosis* **2008**, 88, 122-125.
46. Clarithromycin. *Tuberculosis* **2008**, 88, 92-95.
47. Bernstein, J.; Lott, W. A.; Steinberg, B. A.; Yale, H. L. Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazid) and related compounds. *Am Rev Tuberc* **1952**, 65, 357-64.
48. Middlebrook, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. *Am Rev Tuberc* **1952**, 65, 765-7.

49. Quemard, A.; Sacchettini, J. C.; Dessen, A.; Vilcheze, C.; Bittman, R.; Jacobs, W. R.; Blanchard, J. S. Enzymic Characterization of the Target for Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **1995**, 34, 8235-8241.
50. Vilcheze, C.; Wang, F.; Arai, M.; HazbĀn, M. H.; Colangeli, R.; Kremer, L.; Weisbrod, T. R.; Alland, D.; Sacchettini, J. C.; Jacobs, J. W. R. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med* **2006**, 12, 1027-1029.
51. Labana, S.; Pandey, R.; Sharma, S.; Khuller, G. K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. *Int J Antimicrob Agents* **2002**, 20, 301-304.
52. Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W., Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **1994**, 263, 227-230.
53. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Locht, C.; Besra, G. S. Activation of the Pro-drug Ethionamide Is Regulated in *Mycobacteria*. *J Biol Chem* **2000**, 275, 28326-28331.
54. Di Perri, G.; Bonora, S. Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? *J Antimicrob Chemother* **2004**, 54, 593-602.
55. Rastogi, N.; Labrousse, V.; Goh, K. S. In Vitro Activities of Fourteen Antimicrobial Agents Against Drug Susceptible and Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and Comparative Intracellular Activities Against the Virulent H37Rv Strain in Human Macrophages. *Curr Microbiol* **1996**, 33, 167-175.
56. Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R., Jr.; Sacchettini, J. C. Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *J Exp Med* **2007**, 204, 73-78.
57. Escuyer, V. E.; Lety, M.-A.; Torrelles, J. B.; Khoo, K.-H.; Tang, J.-B.; Rithner, C. D.; Frehel, C.; McNeil, M. R.; Brennan, P. J.; Chatterjee, D. The Role of the *embA* and *embB* Gene Products in the Biosynthesis of the Terminal

Hexaarabinofuranosyl Motif of Mycobacterium smegmatis Arabinogalactan. *J Biol Chem* **2001**, 276, 48854-48862.

58. Bogatcheva, E.; Hanrahan, C.; Nikonenko, B.; Samala, R.; Chen, P.; Gearhart, J.; Barbosa, F.; Einck, L.; Nacy, C. A.; Protopopova, M. Identification of New Diamine Scaffolds with Activity against Mycobacterium tuberculosis. *J Med Chem* **2006**, 49, 3045-3048.

59. Chacon, O.; Feng, Z.; Harris, N. B.; Caceres, N. E.; Adams, L. G.; Barletta, R. G. Mycobacterium smegmatis D-Alanine Racemase Mutants Are Not Dependent on D-Alanine for Growth. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 47-54.

60. Thompson, L. T.; Moskal, J. R.; Disterhoft, J. F. Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature* **1992**, 359, 638-641.

61. Gabriela Iurcu Mustata, T. A. S., James M. Briggs,. Molecular dynamics studies of alanine racemase: A structural model for drug design. *Biopolymers* **2003**, 70, 186-200.

62. Dalhoff, A.; Janjic, N.; Echols, R. Redefining penems. *Biochem Pharmacol* **2006**, 71, 1085-1095.

63. Oliva, B.; O'Neill, A. J.; Miller, K.; Stubbings, W.; Chopra, I. Anti-staphylococcal activity and mode of action of clofazimine. *J Antimicrob Chemother* **2004**, 53, 435-40.

64. Matlola, N. M.; Steel, H. C.; Anderson, R. Antimycobacterial action of B4128, a novel tetramethylpiperidyl-substituted phenazine. *J Antimicrob Chemother* **2001**, 47, 199-202.

65. Janin, Y. L. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorg Med Chem* **2007**, 15, 2479-2513.

66. Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, 407, 340-8.

67. Niederweis, M. Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* **2003**, 49, 1167-77.

68. Senaratne, R. H.; Mobasher, H.; Papavinasundaram, K. G.; Jenner, P.; Lea, E. J.; Draper, P. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **1998**, 180, 3541-7.
69. Wilson, D. N.; Harms, J. M.; Nierhaus, K. H.; Schlunzen, F.; Fucini, P. Species-specific antibiotic-ribosome interactions: implications for drug development. *Biol Chem* **2005**, 386, 1239-52.
70. Rastogi, N.; Goh, K. S.; David, H. L. Enhancement of drug susceptibility of *Mycobacterium avium* by inhibitors of cell envelope synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**, 34, 759-64.
71. Falzari, K.; Zhu, Z.; Pan, D.; Liu, H.; Hongmanee, P.; Franzblau, S. G. In vitro and in vivo activities of macrolide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 1447-54.
72. Luna-Herrera, J.; Reddy, V. M.; Daneluzzi, D.; Gangadharam, P. R. Antituberculosis activity of clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**, 39, 2692-5.
73. Bosne-David, S.; Barros, V.; Verde, S. C.; Portugal, C.; David, H. L. Intrinsic resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to clarithromycin is effectively reversed by subinhibitory concentrations of cell wall inhibitors. *J Antimicrob Chemother* **2000**, 46, 391-5.
74. Katz, L.; Ashley, G. W. Translation and protein synthesis: macrolides. *Chem Rev* **2005**, 105, 499-528.
75. Colca, J. R.; McDonald, W. G.; Waldon, D. J.; Thomasco, L. M.; Gadwood, R. C.; Lund, E. T.; Cavey, G. S.; Mathews, W. R.; Adams, L. D.; Cecil, E. T.; Pearson, J. D.; Bock, J. H.; Mott, J. E.; Shinabarger, D. L.; Xiong, L.; Mankin, A. S. Cross-linking in the Living Cell Locates the Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics. *J Biol Chem* **2003**, 278, 21972-21979.
76. Bush, K.; Macielag, M.; Weidner-Wells, M. Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond phase 1. *Curr Opin Microbiol* **2004**, 7, 466-76.
77. de Souza, M. V. N. Promising Drugs Against Tuberculosis. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* **2006**, 1, 33-44.

78. Rengarajan, J.; Sasseti, C. M.; Naroditskaya, V.; Sloutsky, A.; Bloom, B. R.; Rubin, E. J. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol* **2004**, *53*, 275-82.
79. Li, R.; Sirawaraporn, R.; Chitnumsub, P.; Sirawaraporn, W.; Wooden, J.; Athappilly, F.; Turley, S.; Hol, W. G. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *J Mol Biol* **2000**, *295*, 307-23.
80. Then, R. L. Antimicrobial dihydrofolate reductase inhibitors--achievements and future options: review. *J Chemother* **2004**, *16*, 3-12.
81. WHO. The Immunological Basis for Immunization Series Module 5: Tuberculosis; WHO: Geneve, 1993.
82. Andersson, M. I.; MacGowan, A. P. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* **2003**, *51*, 1-11.
83. Corbett, K. D.; Berger, J. M. STRUCTURE, MOLECULAR MECHANISMS, AND EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS IN DNA TOPOISOMERASES. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* **2004**, *33*, 95-C-6.
84. Aubry, A.; Pan, X. S.; Fisher, L. M.; Jarlier, V.; Cambau, E. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*, 1281-8.
85. Sriram, D.; Yogeewari, P.; Basha, J. S.; Radha, D. R.; Nagaraja, V. Synthesis and antimycobacterial evaluation of various 7-substituted ciprofloxacin derivatives. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 5774-5778.
86. Tuberculosis Research Centre (Indian Council of Medical Research), C. Shortening Short Course Chemotherapy : A Randomised Clinical Trial for Treatment of Smear Positive Pulmonary Tuberculosis with Regimens Using Ofloxacin in the Intensive Phase. *Ind J Tub* **2002**, *49*, 27-38.
87. Alvarez-Freites, E. J.; Carter, J. L.; Cynamon, M. H. In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, *46*, 1022-5.
88. Nuermberger, E. L.; Yoshimatsu, T.; Tyagi, S.; Williams, K.; Rosenthal, I.; O'Brien, R. J.; Vernon, A. A.; Chaisson, R. E.; Bishai, W. R.; Grosset, J. H. Moxifloxacin-containing Regimens of Reduced Duration Produce a

Stable Cure in Murine Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2004**, 170, 1131-1134.

89. 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.; Jarlier, V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2005**, 307, 223-227.

90. Danelishvili, L.; Wu, M.; Young, L. S.; Bermudez, L. E. Genomic approach to identifying the putative target of and mechanisms of resistance to mefloquine in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 3707-14.

91. Martin-Galiano, A. J.; Gorgojo, B.; Kunin, C. M.; de la Campa, A. G. Mefloquine and new related compounds target the F(0) complex of the F(0)F(1) H(+)-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 1680-7.

92. Savini, L.; Chiasserini, L.; Gaeta, A.; Pellerano, C. Synthesis and anti-tubercular evaluation of 4-quinolyldrazones. *Bioorg Med Chem* **2002**, 10, 2193-2198.

93. Vangapandu, S.; Jain, M.; Jain, R.; Kaur, S.; Pal Singh, P. Ring-substituted quinolines as potential anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 2501-2508.

94. Nayyar, A.; Malde, A.; Jain, R.; Coutinho, E. 3D-QSAR study of ring-substituted quinoline class of anti-tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem* **2006**, 14, 847-856.

95. Tyagi, S.; Nuernberger, E.; Yoshimatsu, T.; Williams, K.; Rosenthal, I.; Lounis, N.; Bishai, W.; Grosset, J. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 2289-93.

96. Santo, R. D.; Costi, R.; Artico, M.; Massa, S.; Lampis, G.; Deidda, D.; Pompei, R. Pyrrolnitrin and related pyrroles endowed with antibacterial activities against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**, 8, 2931-2936.

97. Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.;

Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E., 3rd. PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. *Science* **2008**, 322, 1392-5.

98. Deidda, D.; Lampis, G.; Fioravanti, R.; Biava, M.; Porretta, G. C.; Zanetti, S.; Pompei, R. Bactericidal activities of the pyrrole derivative BM212 against multidrug-resistant and intramacrophagic Mycobacterium tuberculosis strains. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 3035-7.

99. Lee, R. E.; Protopopova, M.; Crooks, E.; Slayden, R. A.; Terrot, M.; Barry, C. E. Combinatorial Lead Optimization of [1,2]-Diamines Based on Ethambutol as Potential Antituberculosis Preclinical Candidates. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2003**, 5, 172-187.

100. Lee, J.; Tomaszewski, J. E.; Hanrahan, C.; Coward, L.; Noker, P.; Gorman, G.; Nikonenko, B.; Protopopova, M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Brit J Pharmacol* **2005**, 144, 80-87.

101. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* **1997**, 23, 3-25.

102. Sun, Z.; Zhang, Y. Antituberculosis activity of certain antifungal and antihelminthic drugs. *Tuber Lung Dis* **1999**, 79, 319-20.

103. Ahmad, Z.; Sharma, S.; Khuller, G. K.; Singh, P.; Faujdar, J.; Katoch, V. M. Antimycobacterial activity of econazole against multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents* **2006**, 28, 543-4.

104. Matsuura, K.; Yoshioka, S.; Tosha, T.; Hori, H.; Ishimori, K.; Kitagawa, T.; Morishima, I.; Kagawa, N.; Waterman, M. R. Structural diversities of active site in clinical azole-bound forms between sterol 14 α -demethylases (CYP51s) from human and Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem* **2005**, 280, 9088-96.

105. Menozzi, G.; Merello, L.; Fossa, P.; Schenone, S.; Ranise, A.; Mosti, L.; Bondavalli, F.; Loddo, R.; Murgioni, C.; Mascia, V.; La Colla, P.; Tamburini, E. Synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of

halogenated 4-[1H-imidazol-1-yl(phenyl)methyl]-1,5-diphenyl-1H-pyrazoles. *Bioorg Med Chem* **2004**, 12, 5465-83.

106. Bramhill, D. Bacterial cell division. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1997**, 13, 395-424.

107. Huang, Q.; Kirikae, F.; Kirikae, T.; Pepe, A.; Amin, A.; Respicio, L.; Slayden, R. A.; Tonge, P. J.; Ojima, I. Targeting FtsZ for antituberculosis drug discovery: noncytotoxic taxanes as novel antituberculosis agents. *J Med Chem* **2006**, 49, 463-6.

108. Slayden, R. A.; Knudson, D. L.; Belisle, J. T. Identification of cell cycle regulators in *Mycobacterium tuberculosis* by inhibition of septum formation and global transcriptional analysis. *Microbiology* **2006**, 152, 1789-97.

109. Grandoni, J. A.; Marta, P. T.; Schloss, J. V. Inhibitors of branched-chain amino acid biosynthesis as potential antituberculosis agents. *J Antimicrob Chemother* **1998**, 42, 475-82.

110. Choi, K. J.; Yu, Y. G.; Hahn, H. G.; Choi, J. D.; Yoon, M. Y. Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Lett* **2005**, 579, 4903-10.

111. Munier-Lehmann, H.; Chaffotte, A.; Pochet, S.; Labesse, G. Thymidylate kinase of *Mycobacterium tuberculosis*: a chimera sharing properties common to eukaryotic and bacterial enzymes. *Protein Sci* **2001**, 10, 1195-205.

112. Douguet, D.; Munier-Lehmann, H.; Labesse, G.; Pochet, S. LEA3D: a computer-aided ligand design for structure-based drug design. *J Med Chem* **2005**, 48, 2457-68.

113. Rai, D.; Johar, M.; Manning, T.; Agrawal, B.; Kunimoto, D. Y.; Kumar, R. Design and studies of novel 5-substituted alkynylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. *J Med Chem* **2005**, 48, 7012-7.

114. Koul, A.; Herget, T.; Klebl, B.; Ullrich, A. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol* **2004**, 2, 189-202.

115. Matyk, J.; Waisser, K.; Drazková, K.; Kunes, J.; Klimesová, V.; Palát, J. K.; Kaustová, J. Heterocyclic isosters of antimycobacterial salicylanilides. *Farmaco* **2005**, 60, 399-408.

116. Walburger, A.; Koul, A.; Ferrari, G.; Nguyen, L.; Prescianotto-Baschong, C.; Huygen, K.; Klebl, B.; Thompson, C.; Bacher, G.; Pieters, J. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* **2004**, 304, 1800-4.
117. Bettencourt, M. V.; Bosne-David, S.; Amaral, L. Comparative in vitro activity of phenothiazines against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* **2000**, 16, 69-71.
118. Garbe, T. R. Co-induction of methyltransferase Rv0560c by naphthoquinones and fibric acids suggests attenuation of isoprenoid quinone action in *Mycobacterium tuberculosis*. *Can J Microbiol* **2004**, 50, 771-8.
119. Tsenova, L.; Mangaliso, B.; Muller, G.; Chen, Y.; Freedman, V. H.; Stirling, D.; Kaplan, G. Use of IMiD3, a thalidomide analog, as an adjunct to therapy for experimental tuberculous meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**, 46, 1887-95.
120. Velezheva, V. S.; Brennan, P. J.; Marshakov, V. Y.; Gusev, D. V.; Lisichkina, I. N.; Peregudov, A. S.; Tchernousova, L. N.; Smirnova, T. G.; Andreevskaya, S. N.; Medvedev, A. E. Novel pyridazino[4,3-b]indoles with dual inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis* and monoamine oxidase. *J Med Chem* **2004**, 47, 3455-61.
121. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Gohlmann, H. W.; 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.; Jarlier, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2005**, 307, 223-7.
122. Somu, R. V.; Wilson, D. J.; Bennett, E. M.; Boshoff, H. I.; Celia, L.; Beck, B. J.; Barry, C. E., 3rd; Aldrich, C. C. Antitubercular nucleosides that inhibit siderophore biosynthesis: SAR of the glycosyl domain. *J Med Chem* **2006**, 49, 7623-35.
123. Nguyen, K. T.; Hu, X.; Colton, C.; Chakrabarti, R.; Zhu, M. X.; Pei, D. Characterization of a human peptide deformylase: implications for antibacterial drug design. *Biochemistry* **2003**, 42, 9952-8.
124. Bhowruth, V.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; F.D. King, B. S. D. P. C. C. F. R. S. C.; G. Lawton, B. S. P. D. C. C. 4 Tuberculosis Chemotherapy: Recent

Developments and Future Perspectives. In *Progress in Medicinal Chemistry*, Elsevier: 2007; Vol. Volume 45, pp 169-203.

125. Bravo, T. C.; Ellard, G. A.; Mitchison, D. A. Reappraisal of the activity of morphazinamide against M. tuberculosis. *Tubercle* **1975**, 56, 211-7.

126. Zierski, M. Comparison of the effect of morphazinamide and pyrazinamide in the treatment of chronic tuberculosis. *Gruzlica* **1965**, 33, 769-71.

127. Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Barry, C. E., 3rd. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol* **2002**, 184, 2167-72.

128. Cynamon, M. H.; Speirs, R. J.; Welch, J. T. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42, 462-3.

129. Yamamoto, S.; Toida, I.; Watanabe, N.; Ura, T. In vitro antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**, 39, 2088-91.

130. Sriram, D.; Yogeewari, P.; Reddy, S. P. Synthesis of pyrazinamide Mannich bases and its antitubercular properties. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, 16, 2113-2116.

131. Imramovský, A.; Polanc, S.; Vinsová, J.; Kocevar, M.; Jampílek, J.; Recková, Z.; Kaustová, J. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorg Med Chem* **2007**, 15, 2551-2559.

132. Chung, W. J.; Kornilov, A.; Brodsky, B. H.; Higgins, M.; Sanchez, T.; Heifets, L. B.; Cynamon, M. H.; Welch, J. Inhibition of M. tuberculosis in vitro in monocytes and in mice by aminomethylene pyrazinamide analogs. *Tuberculosis (Edinb)* **2008**, 88, 410-9.

133. Krinková, J.; Dolezal, M.; Hartl, J.; Buchta, V.; Pour, M. Synthesis and biological activity of 5-alkyl-6-(alkylsulfanyl)- or 5-alkyl-6-(arylsulfanyl)pyrazine-2-carboxamides and corresponding thioamides. *Farmaco* **2002**, 57, 71-78.

134. Dolezal, M.; Jampílek, J.; Osicka, Z.; Kunes, J.; Buchta, V.; Víchová, P. Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco* **2003**, 58, 1105-1111.

135. Dolezal, M.; Cmedlova, P.; Palek, L.; Vinsova, J.; Kunes, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *Eur J Med Chem* **2008**, 43, 1105-1113.
136. Dolezal, M.; Miletin, M.; Kunes, J.; Kralova, K. Substituted Amides of Pyrazine-2-carboxylic acids: Synthesis and Biological Activity. *Molecules* **2002**, 7, 363-373.
137. Dolezal, M.; Palek, L.; Vinsova, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. Substituted Pyrazinecarboxamides: Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2006**, 11, 242-256.
138. Palek, L.; Dvořák, J.; Svobodová, M.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Doležal, M. Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Arch Pharm* **2008**, 341, 61-65.
139. Dlabal, K. P., K.; Lyčka, A.; Odlerová, Ž. Synthesis and ¹H and ¹³C NMR spectra of sulfur derivatives of pyrazine derived from amidation product of 2-chloropyrazine and 6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile. Tuberculostatic activity. *Collect Czech Chem Commun* **1990**, 55, 2493-2501.
140. Doležal, M. Spolupráce studentů při syntéze potenciálních antituberkulotik. In FRVŠ: 2001.
141. Hartl, J. Study of potential drugs derivatived from pyrazine. In GA-UK: 1993.
142. Hartl, J. Study of potential drugs derivatived from pyrazine. In GA-UK: 1995.
143. Palek, L. Inovace praktického cvičení: optimalizace syntézy a separace derivátů 2,5-pyrazindikarbonitrilu a hodnocení jejich biologické aktivity. In FRVŠ: 2006.
144. UK, F. Vývoj, příprava a technologie léčiv. In Výzkumné záměry Univerzity Karlovy 2000-2004.
145. Cook, M.; F.Poole, C.; Wilson, I. D. *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press: New York, 2000; p 4808.
146. Institute, C. a. L. S. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Proposed Standard M 27-P. CLSI: Wayne, PA, 1992.

147. Sheehan, D. J. E.-I., A.; Steele, M.; Webb, C.D. Antifungal susceptibility testing of yeasts : a brief overview. *Clin Infect Dis* **1993**, 17, S494-S500.
148. Zhang, Y.; Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**, 7, 6-21.
149. Malone, L.; Schurr, A.; Lindh, H.; Mc, K. D.; Kiser, J. S.; Williams, J. H. The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *Am Rev Tuberc* **1952**, 65, 511-8.
150. Solotorovsky, M.; Gregory, F. J.; Ironson, E. J.; Bugie, E. J.; O'Neill, R. C.; Pfister, R., 3rd. Pyrazinoic acid amide; an agent active against experimental murine tuberculosis. *Proc Soc Exp Biol Med* **1952**, 79, 563-5.
151. Dessau, F. I.; Yeager, R. L.; Burger, F. J.; Williams, J. H. Pyrazinamide (aldinamide) in experimental tuberculosis of the guinea pig. *Am Rev Tuberc* **1952**, 65, 519-22.
152. Mc Dermott, W.; Tompsett, R. Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro. *Am Rev Tuberc* **1954**, 70, 748-54.
153. Zhang, Y.; Permar, S.; Sun, Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Med Microbiol* **2002**, 51, 42-49.
154. Campagna, M.; Calix, A.; Hauser, G. Observations on the combined use of pyrazinamide (Aldinamide) and isoniazid in the treatment of pulmonary tuberculosis; a clinical study. *Am Rev Tuberc* **1954**, 69, 334-50.
155. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Bacteriol* **1999**, 181, 2044-9.
156. Scorpio, A.; Lindholm-Levy, P.; Heifets, L.; Gilman, R.; Siddiqi, S.; Cynamon, M.; Zhang, Y. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, 540-3.
157. Neyfakh, A. A.; Bidnenko, V. E.; Chen, L. B. Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, 88, 4781-5.

158. Zimhony, O.; Cox, J. S.; Welch, J. T.; Vilcheze, C.; Jacobs, W. R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **2000**, *6*, 1043.
159. Boshoff, H. I.; Mizrahi, V. Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **1998**, *180*, 5809-14.
160. Boshoff, H. I.; Mizrahi, V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *Mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. *J Bacteriol* **2000**, *182*, 5479-85.
161. Miller, M. A.; Thibert, L.; Desjardins, F.; Siddiqi, S. H.; Dascal, A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. *J Clin Microbiol* **1995**, *33*, 2468-70.
162. McClatchy, J. K.; Tsang, A. Y.; Cernich, M. S. Use of pyrazinamidase activity on *Mycobacterium tuberculosis* as a rapid method for determination of pyrazinamide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **1981**, *20*, 556-7.
163. Peer, H. G. v. d. H., A. *Rec Trav Chim* **1969**, *88*, 1335.
164. Sato, N.; Matsui, N. Studies on Pyrazines. 24. A Simple and Versatile Synthetic Method for 3-Alkoxy- and 3-Aminopyrazinecarbonitriles. *J Heterocycl Chem* **1992**, *29*, 1689-1692.
165. Houminer, Y.; Southwick, E. W.; Williams, D. L. Substituent-directing effects in the homolytic acylation of pyrazine derivatives. *J Org Chem* **1989**, *54*, 640-643.
166. Müller, E. *Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl)*. Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1989.
167. Heinisch, G. L., G. A new, convenient synthesis of monoaroylpyrazines via homolytic substitution. *Synthesis* **1988**, *13*, 119-121.
168. Melloni, P. T., A.; Munari, S. *Gaz Chim Ital* **1985**, *115*.
169. Jampílek, J. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 2000.

170. Sheldon, R. A. K., Y.K. *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*, Academic Press: New York, 1981.
171. Baďura, R. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 1993.
172. Horová, J. Diplomová Práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, 1994.
173. Doležal, M.; Jampílek, J.; Osička, Z.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Víchová, P. Substituted 5-arylpiazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco* **2003**, 38, 1105-1111.
174. Fontana, F.; Minisci, F.; Barbosa, M. C. Homolytic acylation of protonated pyridines and pyrazines with .alpha.-keto acids: the problem of monoacylation. *J Org Chem* **1991**, 56, 2866-2869.
175. Sato, N.; Kadota, H. Studies on Pyrazine. 23. Homolytic Acylation of 2-Amino-3-cyanopyrazine and the Related Compounds with a-Keto Acids: A Synthesis of 5-Acyl-3-aminopyrazinecarboxylic Acid Derivatives. *J Heterocycl Chem* **1992**, 29, 1685-1688.
176. Okada, S. K., A.; Konno, T.; Uchimaru, F. Studies on Pyrazine Derivatives. II. Synthesis, Reactions, and Spectra of Pyrazine N-Oxide Derivatives. *Chem Pharm Bull* **1971**, 19, 1344-1357.
177. Klein, B. B., J. Pyrazines. I. Pyrazine-N-oxides. Preparation and Spectral Characteristics. *J Am Chem Soc* **1959**, 81, 5160-5166.
178. Ochiai, K. *Chem Pharm Bull* **1968**, 8.
179. Bernardi, L. P., G.; Leone, A.; Larini, G. *Gaz Chim Ital* **1961**, 91.
180. Uchimaru, F. O., S.; Kosasayama, A.; Konno, T. *Chem Pharm Bull* **1971**, 19.
181. Foks, H. Pyrazine-2-carboxylic acid N-oxides. IV. Reaction of pyrazine-2-carboxamide 4-N-oxide with phosphorus oxychloride. *Acta Pol Pharm* **1976**, 33, 153-161.
182. Foks, H. S., J. N-Oxides of 2-Pyrazinecarboxylic Acid. *Acta Pol Pharm* **1964**, 21, 429-36.
183. Foks, H. S., J. N-oxides of pyrazine-2-carboxylic acid. II. Reaction of derivatives of N-oxide of pyrazine-2-carboxylic acid with acetic anhydride. *Acta Pol Pharm* **1966**, 23, 411-16.

184. Palmer, M. H. *The Structure and Reactions of Heterocyclic Compounds*, Arnold Publisher Ltd.: London, 1967.
185. Nováček, L. P., K.; Čeladník, M.; Kubala, E. *Cesk. Farm.* **1972**, 21.
186. Nováček, L. P., K.; Čeladník, M.; Holík, M. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1972**, 37.
187. Asai, M. Chemotherapeutics. VII. Synthesis of pyrazinamide derivatives. *Yakugaku Zasshi* **1961**, 81, 1475-8.
188. Palamidessi, G. V., A.; Zarini, F. On the Reaction of Phosphorus Oxychloride with Pyrazinecarboxamide 4-Oxide. *J Heterocycl Chem* **1974**, 11, 607-610.
189. Fujii, S. T., T.; Seki, M. Synthesis of 2-(D-Arabino-tetrahydroxybutyl)pyrazine-5-sulfonic Acid. *Agri Biol Chem* **1982**, 46, 2169-2172.
190. Sato, N. *J Chem Res Miniprint* **1984**, 10.
191. Sato, N.; Fujii, M. *J Heterocycl Chem* **1994**, 31.
192. Abe, Y.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F. *Japan* **1969**.
193. Červinka, A. O. *Chemie organických sloučenin*. SNTL: Praha, 1985.
194. Foks, H. J., M.; Zieleniecki, M. Studies on pyrazine derivatives. Part VIII. Synthesis and tuberculostatic activity of some 6-alkylthio- and 6-phenylthiopyrazine-2-carboxylic acids. *Pol J Pharmacol Pharm* **1977**, 29, 663-73.
195. Portnoy, R. C. USP 4/113/724, 1978.
196. Shipper, E. D., A.R. Studies in Imidazoles. II.1 Imidazo [b] pyrazines_{2,3}. *J Am Chem Soc* **1952**, 74, 350-353.
197. Gabriel, S. S., A. *Ber.* **1907**, 40, 850.
198. Stöhr, C. *J Prakt Chem* **1893**, 47.
199. Foks, H. M., W.; Sienicka, J. Synthesis and tuberculostatic activity of some derivatives of pyrazine-2-carboxylic acid. *Acta Pol Pharm* **1976**, 33, 687-93.
200. Ellingson, R. C. H., R.L. Pyrazine Chemistry. IV. Bromination of 2-Amino-3-carbomethoxypyrazine₁. *J Am Chem Soc* **1949**, 71, 2798.
201. Karmas, G.; Spoerri, P. E. Nucleophilic Displacements on Difunctional Pyrazines. *J Am Chem Soc* **1957**, 79, 680-684.
202. Dalmer, O. W., E. *Ger. Patent* 632/257, 1936.

203. Spoerri, P. E.; Ericsson, A. E. Syntheses in the Pyrazine Series. I. The Curtius and Hofmann Degradation of Pyrazine-2,5-dicarboxylic Acid. *J Am Chem Soc* **1938**, 60, 400-402.
204. Kushner, S. D., H.; Sanjurjo, J.L.; Bach, F.L.; Safir, S.R.; Smith, V.K.; Williams, J.H. Experimental Chemotherapy of Tuberculosis. III. Ethyl Mercaptan and Related Compounds in Tuberculosis. *J Am Chem Soc* **1955**, 77, 1152-1155.
205. Sato, N. Studies on Pyrazines. 18 [1]. A New and Convenient Synthesis of 2-Amino-3-cyanopyrazine. *J Heterocycl Chem* **1989**, 26, 817-819.
206. Sato, N.; Shimomura, Y.; Ohwaki, Y.; Takeuchi, J. *J Chem Soc Perkin Trans I* **1991**.
207. Jampilek, J.; Doležal, M.; Palek, L.; Silva, L.; Buchta, V. Antifungal properties of some arylsulfanylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives. *Folia Pharm Univ Carol* **2005**, 33, 23-29.