

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DERIVÁTY PYRAZINKARBOXYLOVÉ KYSELINY
JAKO POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA
(příprava a studium biologických vlastností)

Disertační práce

Mgr. Jan Zitko

Obor: Farmaceutická chemie
Školitel: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové, listopad 2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracovávání čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.

Tato disertační práce vznikla za podpory Grantové agentury ČR (projekt B-CH/120509) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (granty MSM0021620822 a SVV-2011-263-001).

V Hradci Králové, 15. 11. 2011

.....
Mgr. Jan Zitko

Na tomto místě bych chtěl poděkovat zejména mému školiteli, prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za vedení a cenné praktické rady, které přispěly ke vzniku této práce. Děkuji rovněž všem spolupracovníkům z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za plodnou spolupráci a vytvoření tvůrčí atmosféry na pracovišti. Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter. Doc. PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D. poskytl neocenitelnou pomoc při měření lipofility některých látek a především při vyvozování závislosti účinku na parametrech lipofility.

Za provedení testů antituberkulotické aktivity patří můj velký dík MUDr. Michaele Svobodové, doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., MUDr. Pavle Paterové a vedoucí laborantce Silvě Čermákové z Mikrobiologického ústavu Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Testy na antimykotickou a antibakteriální aktivitu precizně provedly paní Ida Dufková a Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D., kterým tímto rovněž děkuji. PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. pak děkuji za možnost využívání vybavení na Katedře biologických a lékařských věd.

V neposlední řadě děkuji i Grantové agentuře ČR a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy ČR za finanční podporu našich projektů.

Seznam použitých zkratek a symbolů

DIARQs	diarylchinoliny
DMSO	dimethylsulfoxid
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course – systém terapie tuberkulózy založený na přímém dohledu na probíhající léčbu a užívání léků
EMB	ethambutol
FAD	flavin adenin dinukleotid
FAS I	Fatty Acid Synthase I – enzymatický komplex mykobaktérií podílející se na syntéze vyšších mastných kyselin s dlouhým řetězcem
HIV	Human Immunodeficiency Virus
INH	isoniazid
<i>M. tbc</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	Multidrug resistant tuberculosis
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MOTTs	Mycobacteria Other Than Tuberculosis – atypická mykobaktéria, v kontextu této práce především <i>M. avium</i> a <i>M. kansasii</i>
MRSA	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	hmotnostní spektrometrie
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Národní institut pro alergie a infekční nemoci), USA
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAS	<i>para</i> -aminosalicylová kyselina
POA	pyrazinkarboxylová kyselina
PZA	pyrazinamid
RIF	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
SAR	Structure-Activity Relationships – vztahy mezi strukturou a účinkem
TAACF	Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility – program USA zaměřený na podporu výzkumu nových antituberkulotik
TBC	tuberkulóza

THF	tetrahydrofuran
VERO	buněčná linie původně izolovaná z opičích ledvin, používaná jako častý model savčích buněk
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
XDR-TB	Extensively drug resistant tuberculosis

OBSAH:

1	FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ.....	8
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
3.1	Tuberkulóza	11
3.1.1	Mycobacterium tuberculosis	11
3.1.2	Patogeneze tuberkulózy.....	12
3.1.3	Epidemiologie tuberkulózy	13
3.1.4	Epidemiologie rezistentních forem tuberkulózy.....	17
3.1.5	Tuberkulóza a epidemie HIV	18
3.2	Současná farmakoterapie tuberkulózy.....	20
3.2.1	Antituberkulotika první volby	21
3.2.2	Antituberkulotika druhé linie.....	23
3.2.3	Antituberkulotika v klinických studiích	27
3.2.4	Potencionální nové cíle pro farmakoterapeutický zásah.....	31
3.2.5	Terapeutická strategie a standardní terapeutické režimy	32
3.2.6	Terapie rezistentních forem tuberkulózy	33
3.3	Pyrazinamid	35
3.3.1	Mechanismus účinku PZA	35
3.3.2	Možné specifické účinky pyrazinamidu a kys. pyrazinkarboxylové	36
3.3.3	Farmakokinetika pyrazinamidu	39
3.3.4	Nežádoucí účinky pyrazinamidu	40
3.4	Chemické obměny struktury pyrazinamidu jako snaha o vývoj nových antituberkulotik ...	42
3.4.1	Polohové isomerie pyrazinového jádra.....	42
3.4.2	Jednoduché substituce pyrazinového jádra.....	42
3.4.3	Jednoduché obměny karboxamidové funkce.....	43
3.4.4	Estery pyrazinkarboxylové kyseliny jako proléčiva.....	44
3.4.5	N-substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny	45
3.4.6	Pyrazinamid jako součást chinoxalinového skeletu.....	47
3.4.7	Jiné deriváty pyrazinamidu.....	49
4	METODICKÁ ČÁST	50
4.1	Používané syntetické postupy.....	50
4.1	Metodika biologického hodnocení	50

4.1.1	Hodnocení antimykobakteriální aktivity v rámci programu TAACF	50
4.1.2	Hodnocení antimykobakteriální aktivity ve spolupráci s Pardubickou krajskou nemocnicí a Fakultní nemocnicí v Hradci Králové	52
4.1.3	Hodnocení antifungální aktivity	54
4.1.4	Hodnocení antibakteriální aktivity	54
4.1.5	Jiné <i>in vitro</i> metody testování antimykobakteriální aktivity.....	55
5	KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE.....	58
5.1	Příprava a biologická aktivita <i>N</i>-fenylypyrazin-2-karboxamidů.....	58
5.1.1	Přehled připravených látek	59
5.1.2	Syntéza	59
5.1.3	Antimykobakteriální aktivita.....	60
5.1.4	Závěr.....	61
5.2	Příprava a biologická aktivita nearomaticky <i>N</i>-substituovaných 6-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilů.....	62
5.2.1	Přehled připravených látek	62
5.2.2	Syntéza	62
5.2.3	Antimykobakteriální aktivita.....	66
5.2.4	Antifungální aktivita.....	67
5.2.5	Antimikrobiální aktivita	68
5.2.6	Závěr.....	68
5.3	Příprava a biologická aktivita 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů	69
5.3.1	Přehled připravených látek	69
5.3.2	Syntéza	70
5.3.3	Porovnání vypočítaných parametrů lipofility s experimentálně určeným log <i>k</i>	70
5.3.4	Antimykobakteriální aktivita.....	73
6	ZÁVĚR	76
7	ABSTRAKT	79
8	ABSTRACT.....	80
9	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ	81
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	85
11	SEZNAM PŘÍLOH.....	97

1 FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění provázející lidstvo pravděpodobně již od jeho počátků. Některé odhady hovoří o tom, že až jedna třetina světové populace je nosičem mykobaktérií vyvolávajících toto onemocnění. U většiny těchto přenašečů infekce přechází do latentní formy a klinicky se neprojevuje. Ačkoli relativní i absolutní počet nových případů manifestní TBC již několik let klesá, tempo tohoto poklesu je velmi pomalé - v řádu jednotek procent. V roce 2010 zemřelo vinou TBC dle odhadů celkem 1,5 milionu lidí. I proto je TBC v centru pozornosti Světové zdravotnické organizace (WHO). Velice znepokojivým faktorem epidemiologie TBC je stále se zvětšující podíl mykobakterióz s rezistencí k běžně používaným antituberkulotikům. Neméně závažný je i problém koinfekce TBC s HIV. U imunokompromitovaných osob je podstatně zvýšené riziko rozvoje aktivní formy TBC. Zároveň pak TBC patří mezi nejčastější infekční příčiny úmrtí HIV pozitivních.

Samotný patogen vyvolávající toto onemocnění, bakterie rodu *Mycobacteria*, nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis*, má v porovnání s jinými baktériemi řadu specifických vlastností, mezi něž patří především extrémně lipofilní buněčná stěna a její vnější obaly, schopnost intracelulárního parazitismu spojená se schopností přežít uvnitř fagocytárních lysozomů a schopnost dormance – tedy přežívání určitého zlomku mykobakteriální populace ve stadiu nízké metabolické aktivity. Tyto zmíněné vlastnosti, které z mykobaktérií činí velmi dobře adaptované patogenní agens, podstatným způsobem znesnadňují farmakoterapii TBC.

Základní terapeutický režim nekomplikované TBC je tvořen kombinací čtyř hlavních antituberkulotik (isoniazidu, rifampicinu, pyrazinu a ethambutolu) a trvá šest měsíců. V komplikovaných případech (relapsy, polyrezistence) se může jednat o mix až sedmi účinných látek a dobu léčby 18, ale i 24 měsíců. Vezmeme-li v potaz časté nežádoucí účinky těchto režimů a subjektivní odeznění příznaků, ke kterému dochází již po několika týdnech terapie, není překvapivé, že compliance pacienta může být zhoršená.

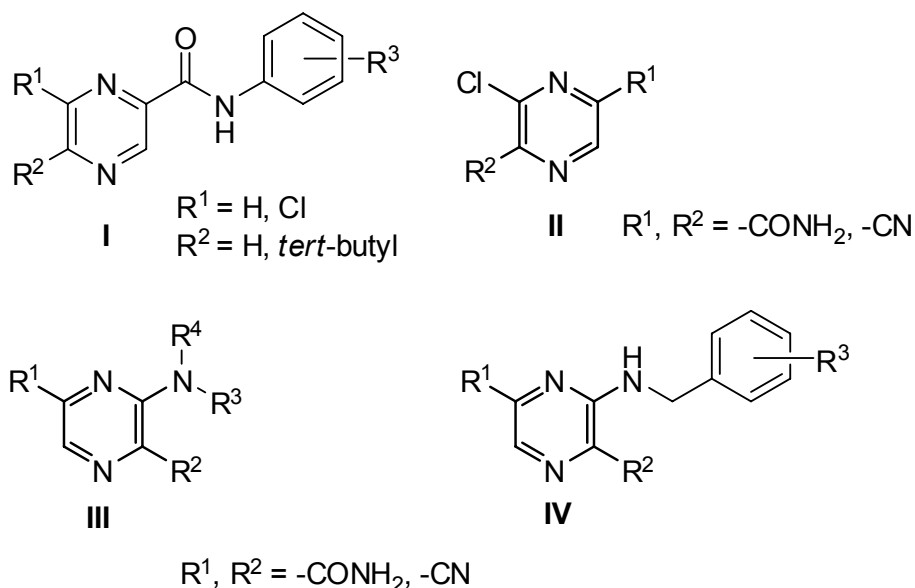
Pyrazinamid (PZA) je antituberkulotikem první linie a je obsažen ve všech základních terapeutických režimech TBC. Má sterilizující účinky, je aktivní i vůči dormantním mykobaktériím a výrazně tak spolu s rifampicinem přispívá ke zkrácení celkové doby léčby. Dle všeobecně nejvíce přijímané teorie je PZA proléčivem a vlastní účinnou látkou je kyselina pyrazinkarboxylová (POA), která účinkuje nespecifickým způsobem. V poslední době se ovšem objevilo i několik dalších teorií, které PZA nebo POA připisují specifický účinek a konkrétní subcelulární cíl. Jiné deriváty PZA/POA, např. 5-chlorpyrazinamid a *n*-

propylester POA, pak vykázaly inhibiční efekt na FAS I (mykobakteriální enzym syntetizující mastné kyseliny s dlouhým alifatickým řetězcem). POA tak představuje vysoce vhodnou výchozí strukturu pro přípravu nových antituberkulotik.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je příprava nových, v literatuře dosud nepopsaných derivátů POA, jejich fyzikálně-chemická charakterizace dostupnými metodami a otestování jejich antituberkulotické aktivity. U některých látek pak bude doplňkově otestována i antifungální a antibakteriální aktivita proti kmenům významně patogenním pro člověka. Na základě takto získaných dat bude provedena diskuze vztahů mezi strukturou a účinkem daných látek (SAR). Příprava derivátů POA jako potencionálních antituberkulotik je součástí dlouhodobého výzkumného záměru Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

Anilidy POA (**I**) budou připraveny standardními metodami a stanou se součástí rozsáhlé série anilidů již připravených kolektivem kolem prof. Doležala. Mnohé tyto anilidy již vykázaly povzbudivou antimykobakteriální aktivitu (viz kapitola 3.4.5). Dalšími látkami pak budou nearonaticky *N*-substituované aminokyanpyrazinkarboxamidy a aminopyrazindikarbonitrily získané reakcí chlorovaných pyrazinových prekurzorů (**II**) s komerčně dostupnými alkylaminy, cykloalkylaminy, heterocyklickými aminy (cílová struktura **III**) a na jádře substituovanými benzylaminy (cílová struktura **IV**). Na základě vyhodnocení vztahů SAR v připravených sériích budou navrženy další obměny.



3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění vyvolané baktériemi druhu *Mycobacterium*, nejčastěji pak druhem *Mycobacterium tuberculosis*, řidčeji potom *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* a *M. microti*. Nejčastěji postihuje plicní tkáň, z níž se ovšem může v některých případech rozšířit i do ostatních částí těla.

Nejstarší nálezy lidských ostatků poznamenaných tuberkulózou pochází z východního středomoří a datují se do doby neolitu, asi 7000 let před naším letopočtem [1]. Mykobakteriální DNA se podařilo izolovat i ze staroegyptských mumií z období 3000 – 2400 let př. n. l. [2]. Mykobaktéria tedy můžeme považovat za vysoce adaptované patogeny velice dobře vybavené proti základním mechanismům lidské imunitní reakce. Původce onemocnění byl popsán až v roce 1882 Robertem Kochem, která za tento objev obdržel v roce 1905 jednu z prvních Nobelových cen za fyziologii a medicínu. *M. tuberculosis* tak bývá označováno jako Kochův bacil.

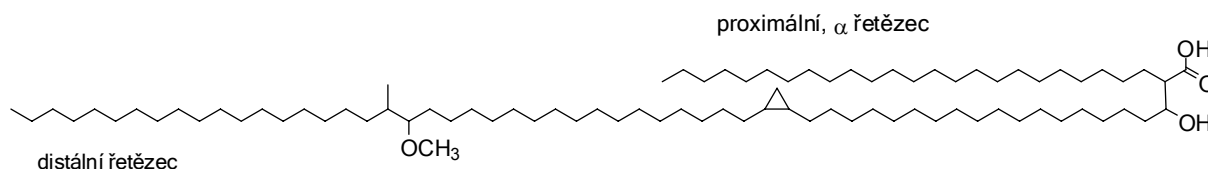
3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis – patogen způsobující většinu případů tuberkulózy – je nepohyblivá, nesporulující, rovná či mírně zahnutá tyčka o rozměrech přibližně 3 x 0,3 µm [3]. Ve vztahu ke kyslíku je to obligatorně aerobní bakterie. V porovnání s většinou ostatních bakterií se vyznačuje velice pomalým růstem a replikací – generační doba činí asi dvacet hodin. Oproti tomu např. u *Escherichia coli* dochází k buněčnému dělení přibližně každých dvacet minut.

Buněčná obaly mykobaktérií jsou velice bohaté na lipidy, které tvoří asi 60 % hmotnosti sušiny [4]. To je mnohem více než u většiny ostatních druhů bakterií. Vysoce lipofilní obaly jsou jedním z hlavních faktorů virulence mykobaktérií. Přispívají k maskování antigenních znaků mykobaktéria (ochrana před imunitní odpovědí hostitele), zapříčiňují rezistenci vůči mnohým běžným antibiotikům (bariérová funkce) a také umožňují mykobaktériím odolávat vyschnutí a přežívat ve volném prostředí. Dle současného poznání se buněčné obaly mykobaktéria skládají ze tří vrstev. Tvoří je plasmatická membrána, buněčná stěna a vnější nekovalentně připojená vrstva glykanů, lipidů a proteinů [5]. Buněčná

stěna je tvořena zesíťovaným peptidoglykanem, na který jsou navázány arabinogalaktany esterifikované extrémně dlouhými mastnými kyselinami – tzv. mykolovými kyselinami, které jsou typické a kromě mykobaktérií se vyskytují pouze u rodů *Nocardia* a *Corynebacteria*. Mykolové kyseliny druhu *Mycobacterium tuberculosis* mají strukturu β -hydroxy kyselin s hlavním řetězcem o délce 54 - 63 uhlíků (tzv. distální řetězec). V poloze α je pak navázán postranní alkylový řetězec o délce 22 - 24 uhlíků (proximální řetězec). Distální řetězec obsahuje jeden až dva cyklopropanové kruhy, případně methoxy nebo karbonylové skupiny. Konfigurace v okolí některých cyklopropanových kruhů může být *trans* [6].

Obrázek 1: Struktura methoxymykolové kyseliny s celkovým počtem 85 uhlíků a cyklopropanovým kruhem v konfiguraci *cis*.



Důležitým novodobým mezníkem v procesu poznávání charakteristik *M. tuberculosis* bylo sekvenování genomu *M. tbc* H37Rv v roce 1998 [7]. Autoři této práce rovněž identifikovali velké množství genů a jejich funkcí.

3.1.2 Patogeneze tuberkulózy

Zpracováno dle literatury [3, 4].

Nejčastějším zdrojem nákazy jsou mykobaktéria šířená vzdušnou cestou ve formě aerosolu, uvolňovaná z dýchacích cest infekčních osob s aktivní (otevřenou) formou TBC. Před zavedením rutinní pasterizace kravského mléka byla jeho konzumace častým způsobem šíření *M. bovis*.

Primární tuberkulóza: Vdechnuté infekční agens se dostává do plicních sklípků, kde je pohlcováno alveolárními makrofágy. Tyto neaktivované makrofágy však nejsou schopny mykobaktéria usmrtit a ty se dále rozmnožují přímo v lysozomech těchto makrofágů (intracelulární parazitismus). S nimi jsou poté roznášeny do regionálních mízních uzlin a mohou se dále lymfatickými a cévními cestami šířit do jiných částí těla. Během 10 – 14 dnů nastupuje specifická reakce imunitního systému. Po prezentaci mykobakteriálních antigenů dochází k produkci specifických klonů T-lymfocytů, které prostřednictvím uvolňovaných lymfokinů aktivují makrofágy. T-lymfocyty a aktivované makrofágy se poté shlukují kolem

ložiska infekce, dochází zde ke splývání buněk a oddělení ložiska infekce od okolního prostoru. Toto ložisko se označuje jako granulom, specifický pojem pro granulom způsobený mykobaktérií je tuberkl. Kromě výše zmíněných buněk se na tvorbě granulomu podílejí i B-lymfocyty a fibroblasty. Střed granulomu je vyplněn nekrotickou tkání a odumřelými makrofágy – podle sýrovitého vzhledu a konzistence se toto označuje jako kaseifikace ložiska. Reakce imunitního systému obvykle výrazně sníží replikaci mykobaktérií, které z větší části vlivem nepříznivých podmínek přechází do klidového stavu a stávají se perzistory, které mohou uvnitř ložiska přežívat mnoho let. Ložisko pak bývá postupem času kalcifikováno. Normální reakcí nekompromitovaného imunitního systému na primární infekci je tak vytvoření jakéhosi rovnovážného stavu mezi patogenem a imunitním systémem.

Postprimární tuberkulóza: K rozvoji postprimární tuberkulózy dochází buďto exogenní reinfekcí či reaktivací primárního ložiska. Reaktivace ložiska může být spontánní nebo spojená s jiným onemocněním (omezením imunitního systému). Reakce imunitního systému na postprimární TBC je ve srovnání s primární fází infekce dalece prudší. Vytvářené granulomy jsou rozsáhlejší a kaseifikace intenzivnější. Aktivované makrofágy produkují velké množství proteolytických enzymů, které změkčují až zkapalňují obsah granulomů a přispívají tak k lokálnímu šíření ohniska infekce. Dochází k propojení ložiska s bronchoalveolárními cestami a jedinec se tak stává plně infekční ve smyslu kapénkového rozsevu infekce. Zároveň se objevují typické symptomy aktivní TBC infekce, mezi které patří kašel, bolest na hrudi, vykašlávání krve, horečka, pocení a později ztráta chuti k jídlu, ztráta hmotnosti a únava.

3.1.3 Epidemiologie tuberkulózy

Tuberkulóza je onemocnění, jehož výskyt se nachází pod intenzivní kontrolou mnoha národních i mezinárodních orgánů, z nichž nejvyšší význam má Světová zdravotnická organizace (WHO). WHO od roku 1994 každoročně uveřejňuje zprávy o TBC – Global Tuberculosis Control.

Dle poslední publikované výroční zprávy WHO uvádějící údaje pro rok 2010 byla **incidence** (tj. počet nových případů v daném roce) 8,8 milionů případů (128 případů / 100 000 obyvatel), **prevalence** (celkový počet infikovaných) 12,0 milionů (178 / 100 000 ob.), a **mortalita** (úmrtnost) 1,1 milionů (15 / 100 000 ob.). K této úmrtnosti je třeba připočítat úmrtí 350 000 HIV pozitivních osob s TBC, neboť tyto případy jsou oficiálně podle mezinárodní klasifikace nemocí evidovány jako úmrtí v důsledku HIV infekce. Odhady

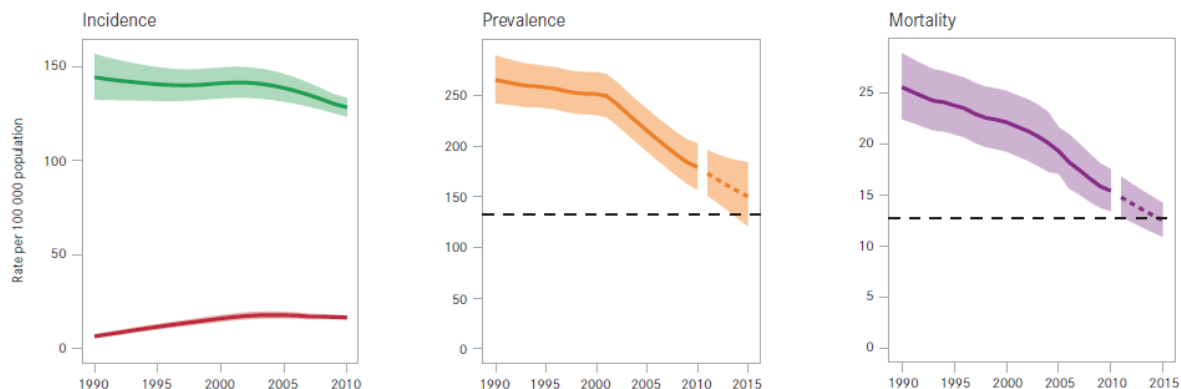
epidemiologických ukazatelů, tak jak byly zveřejněny v jednotlivých výročních zprávách WHO za posledních pět let, shrnuje **Tabulka 1**. V této tabulce můžeme až do roku 2009 sledovat trend stagnace či mírného nárůstu absolutních čísel za současného poklesu relativních ukazatelů – vliv populačního nárůstu.

Tabulka 1: Prevalence, incidence a mortalita dle odhadů WHO v letech 2006 – 2010. Absolutní údaje jsou uváděny v milionech případů, relativní značí počet případů na 100 000 obyvatel, sloupec HIV+, abs. udává absolutní počet úmrtí HIV pozitivních s infekcí TBC.

rok	prevalence		incidence		mortalita			ref.
	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	HIV+, abs.	
2006	14,4	219	9,2	139	1,5	21,6	0,23	[1]
2007	13,7	206	9,3	139	1,3	19,7	0,46	[9]
2008	11,1	164	9,4	139	1,3	20,0	0,50	[10]
2009	14,0	200	9,4	137	1,3	20,0	0,40	[11]
2010	12,0	178	8,8	128	1,1	15,0	0,35	[12]

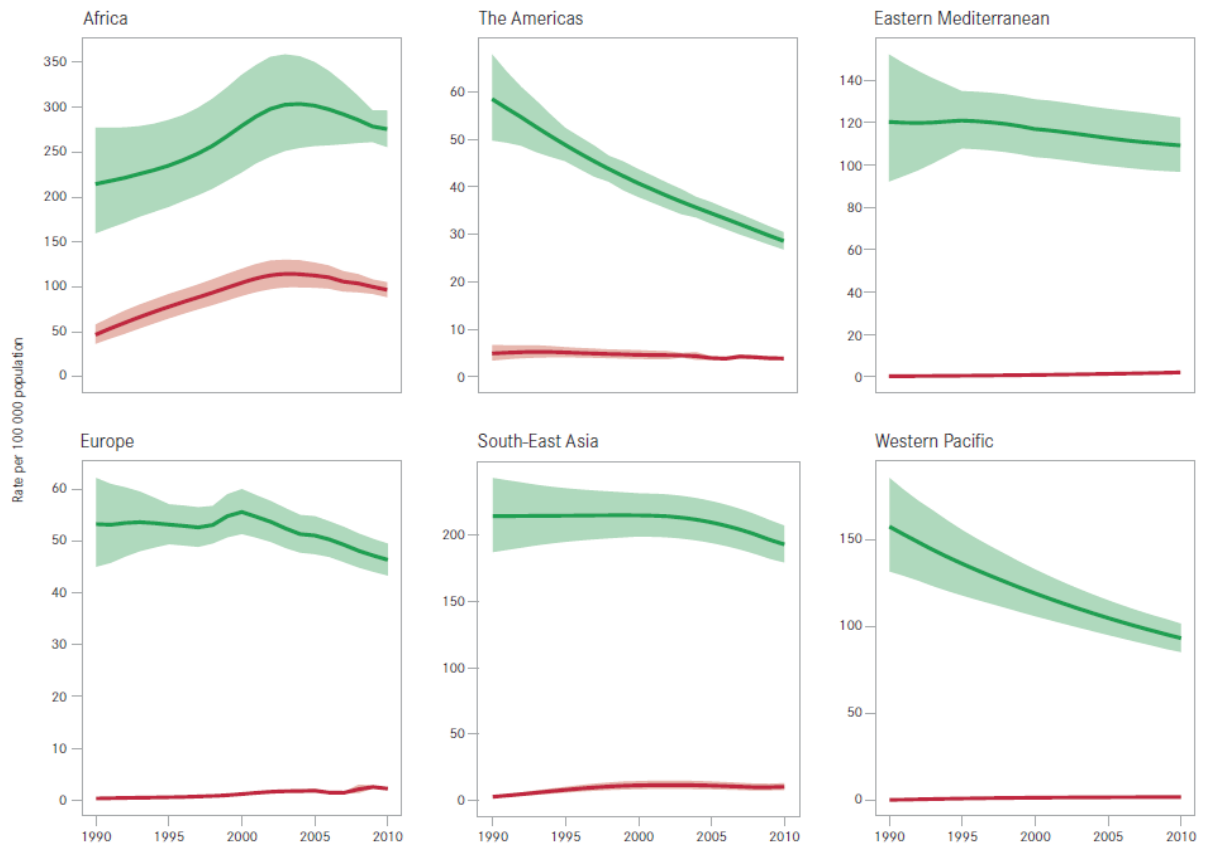
Nicméně v poslední zprávě WHO z roku 2011 [12] (údaje za rok 2010) byly tyto trendy poněkud poopraveny. Relativní incidence v celosvětovém měřítku zvolna klesala v období 1990 až 1997. V roce 1997 - 2001 byl poté zaznamenán prudký nárůst relativní incidence v důsledku vypuknutí epidemie HIV v Africe. Od roku 2002 relativní incidence klesá rychlostí zhruba 1, 3 % ročně. Absolutní incidence začala poté klesat s určitým zpožděním (projevuje se negativní efekt populačního růstu) v roce 2006.

Obrázek 2: Světový trend relativní incidence, prevalence a mortality TBC. Nalevo: zeleně relativní incidence včetně HIV pozitivních, červeně incidence pouze HIV pozitivních. Uprostřed a vpravo: vývoj relativní prevalence a mortality v letech 1990 – 2010 a výhled do roku 2015. Vodorovné přerušované černé linie znázorňují cíle WHO na snížení prevalence a mortality TBC na 50 % vůči hodnotám z roku 1990 a to do roku 2015. Světlejší odstíny barev znázorňují pásy nejistoty. Mortalita nezahrnuje úmrtí mezi HIV pozitivními pacienty. Převzato z Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO document no. WHO/HTM/TB/2011.16. 2011. [12]. Publikováno se svolením WHO.

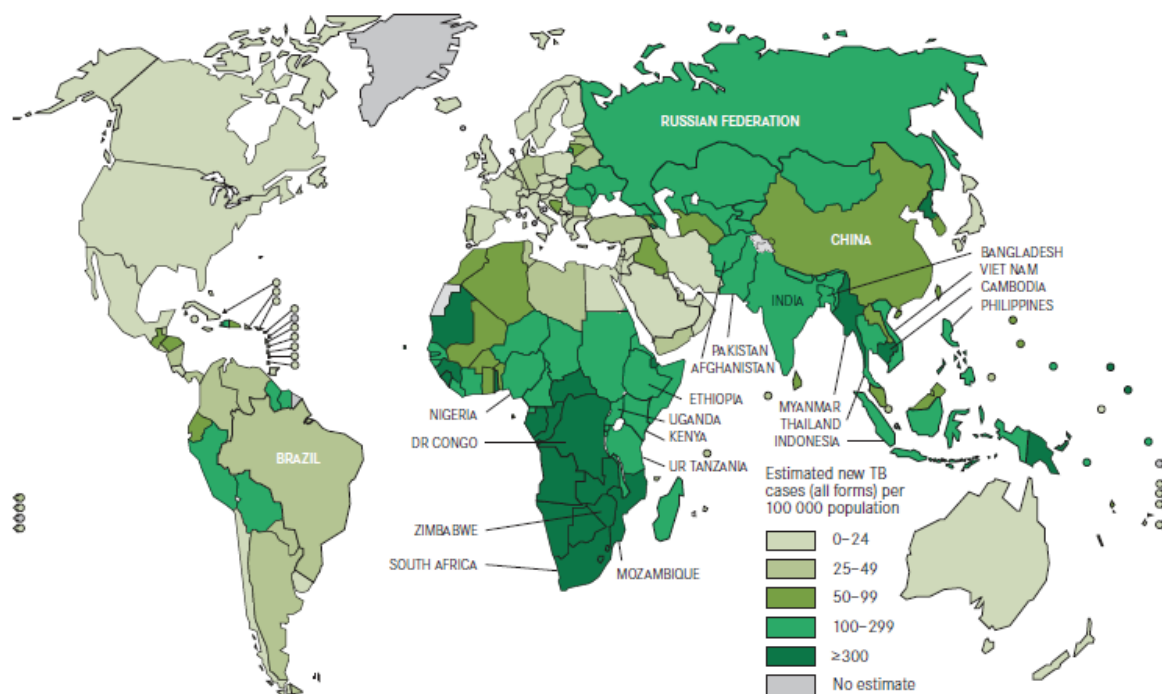


V současné době má incidence TBC klesající tendenci ve všech šesti regionech tak jak ukazuje obrázek. Tempo tohoto poklesu se pohybuje od méně než 1 % (východní středomořská oblast) až po 3, 7 % ročně (oblast Severní a Jižní Ameriky), viz **Obrázek 3**.

Obrázek 3: Odhad relativní incidence TBC v jednotlivých oblastech světa dle TBC. Zeleně odhad relativní incidence, červeně odhad mezi HIV pozitivními. Světější odstíny barev znázorňují pásy nejistoty. Převzato z Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO document no. WHO/HTM/TB/2011.16. 2011. [12]. Publikováno se svolením WHO.



Obrázek 4: Odhad incidence (počet nových případů) tuberkulózy ve světě v roce 2010. Převzato z Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO document no. WHO/HTM/TB/2011.16. 2011. [12]. Publikováno se svolením WHO.



3.1.4 Epidemiologie rezistentních forem tuberkulózy

Z hlediska epidemiologické situace je významným problémem stále častěji se objevující rezistence mykobaktérií vůči standardně používaným léčivům. Dle zavedené terminologie rozlišujeme tzv. **MDR-TB** – Multidrug-resistant tuberculosis – tuberkulózu rezistentní alespoň vůči isoniazidu a rifampicinu; a dále **XDR-TB** – Extensively drug resistant tuberculosis – tuberkulózu definovanou jako MDR-TB s další rezistencí vůči fluorochinolonu a nejméně jednomu dalšímu intravenózně podávanému léčivu druhé volby ze skupiny amikacin, kanamycin, kapreomycin.

Dokument WHO Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) [13] popisuje situaci v oblasti rezistence tuberkulózy v roce 2008. Nejdůležitější poznatky této zprávy jsou shrnuty v následujících odstavcích.

V roce 2008 byl odhadovaný celosvětový výskyt MDR-TB 440 tisíc případů, což představovalo 3,6 % všech případů TBC. Téměř 50 % těchto případů se přitom vyskytlo v Indii a Číně. Další typickou lokalizací pro MDR-TB potom představuje území bývalého Sovětského svazu, konkrétně jeho severozápadní oblast. V roce 2008 pak v důsledku MDR-TB zemřelo odhadem 150 tisíc lidí. Rizikovými faktory pro výskyt rezistence u daného

pacienta jsou HIV a předchozí (pravděpodobně tedy nesprávně vedená) léčba TBC. Znepokojivý je ovšem fakt, že incidence MDR-TB je pravidelně zaznamenávána i u primoinfekce TBC. V některých zemích (východní Evropy a střední Asie) činí poměr MDR-TB vůči všem primoinfekcím TBC až 6 % - u případů s předchozí léčbou TBC je zde MDR-TB zastoupena až v 50 % případů.

XDR-TB bývá většinou diagnostikována dodatečným stanovením citlivosti patogenu MDR-TB. Celosvětově bylo v roce 2008 5,4 % případů MDR-TB diagnostikováno zároveň jako XDR-TB, v rizikových zemích (viz výše) se jedná i o více než 10 %.

Velkým problémem zůstává diagnostika a záchyt případů rezistence mykobaktérií. V roce 2008 bylo oficiálně nahlášeno pouze 29 423 případů MDR-TB, což z odhadovaného počtu 440 000 případů činí pouze 7 %. Důvodem je především špatná dostupnost a nízká kapacita testování v nejpostiženějších oblastech.

3.1.5 Tuberkulóza a epidemie HIV

Koinfekce TBC a HIV je závažným problémem v celosvětovém měřítku, který znesnadňuje kontrolu TBC a dosažení vytyčených cílů snižování incidence této choroby. Některé odhady hovoří o tom, že až jedna třetina světové populace je infikována tuberkulózou. U většiny jedinců s normální reakcí imunitního systému ovšem dojde k ustanovení rovnováhy mezi patogenem a vlastním imunitním systémem a infekce přechází do latentní – klidové fáze, ve které může přetrvat po celý zbytek života daného jedince. Omezení imunitního systému (např. v důsledku HIV) vede k rozvoji aktivní formy TBC infekce. Imunokompromitovaní jedinci s HIV mají dle dat WHO oproti HIV negativním 21 – 34krát vyšší pravděpodobnost, že se u nich rozvine infekce TBC (a toto riziko je vyšší v rozvojových zemích) [12, s. 61]. V roce 2010 bylo z celkově 9 milionů nových případů TBC 1,1 milionu (tedy asi každý desátý) nalezeno u HIV pozitivních [12]. V opačném smyslu je možné říci, že každý diagnostikovaný případ TBC by měl být zároveň testován na HIV, neboť riziko koinfekce je vysoké. Budeme-li sledovat poměr pacientů s diagnostikovanou TBC, kteří se následně podrobili HIV testu a byli pozitivní, vůči všem, kteří se s diagnostikovanou TBC testu HIV podrobili, dostaneme celosvětově 23 %. V rizikové Africe je to potom průměrně 44 %, v nejhůře postižených zemích (např. Svazijsko v jižní Africe) až 88 %. [12].

Interakce mezi *M. tuberculosis* a virem HIV (někdy označovaná jako synergismus) je velmi komplexní a ne všechny mechanismy tohoto jevu jsou objasněny. Zájemce o danou problematiku je možno odkázat například na tento přehledový článek [15].

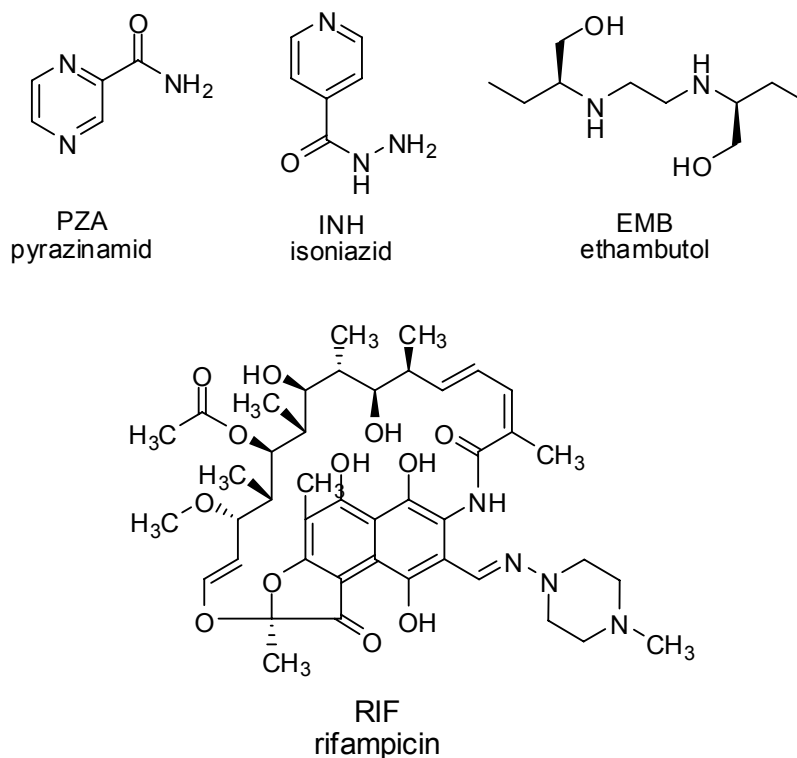
3.2 Současná farmakoterapie tuberkulózy

Farmakoterapie tuberkulózy je z hlediska adherence pacienta k léčbě velmi složitým procesem. Standardní terapeutický režim (viz kapitola 3.2.5) trvá v nekomplikovaném případě plných šest měsíců, přičemž subjektivní obtíže pacienta mizí často již po několika týdnech intenzivní terapie a bývají vystříhány pacientem negativně vnímanými nežádoucími účinky podávaných léčiv. Uvědomíme-li si zároveň, že nemocní TBC pocházejí většinou ze sociálně vyloučených vrstev společnosti nebo z oblastí s nižší dostupností kvalitní zdravotnické péče, je jasné, že dodržování doporučených léčebných režimů v plné délce je mnohdy obtížně sledováno a vynucováno. Přitom nedodržování léčebných režimů je pravděpodobně nejčastější příčinou šíření a vzniku rezistentních forem tuberkulózy [16].

DOTS (Directly Observed Treatment Short-Course) jako iniciativa WHO je celosvětově uznávaná strategie kontroly tuberkulózy. Strategie se osvědčila jako vysoce účinná a zároveň efektivní z hlediska nákladů, což je velmi důležité pro možnost její aplikace i v rozvojových zemích. Její obsah lze shrnout do pěti bodů:

- dostatečná politická a finanční podpora boje proti TBC
- dostupnost mikroskopického vyšetření TBC ze sputa v laboratořích s kontrolou kvality
- krátkodobá terapie pod přímým dohledem
- dostupnost vysoce kvalitních antituberkulotik v čas potřeby
- standardizovaný systém dokumentace průběhu léčby a hlášení výsledků

3.2.1 Antituberkulotika první volby

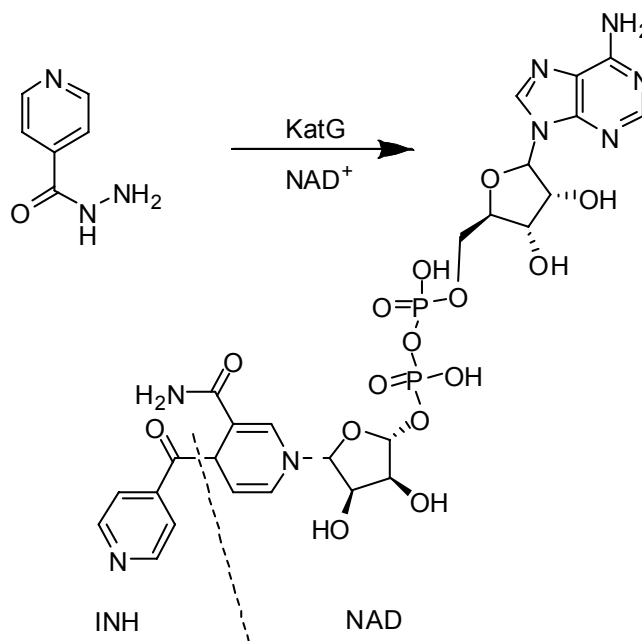


Isoniazid (INH)

Isoniazid, chemicky hydrazid kys. isonikotinové, byl pro antituberkulotickou léčbu objeven podobně jako pyrazinamid, tedy hledáním analogů antituberkuloticky účinného nikotinamidu.

Mechanismus účinku: Isoniazid je mykobakteriální endogenní katalasou-peroxidasou KatG za účasti NAD⁺ oxidován na reaktivní nestabilní intermediát, který se stabilizuje vazbou na NADH [17, 18]. Vzniká tak kovalentně vázaný adukt INH-NAD, ve kterém je zbytek kys. isonikotinové vázán do polohy 4 nikotinamidové části NAD. Tento adukt poté funguje jako inhibitor jiných enzymových systémů mykobaktéria využívajících NADH. Nejdůležitějším inhibovaným enzymem je enoyl acyl carrier protein reductasa (enoyl ACP reductasa, neboli InhA). Tento enzym je součástí enzymatického komplexu FAS II (Fatty Acid Synthase II) a je tak esenciálním pro syntézu mykolových kyselin mykobaktéria. Podobný účinek má poté adukt INH-NADP, který inhibuje NADPH závislou beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductasu MabA ([19], rovněž součástí systému FAS II) a dyhydrofolátreduktasu [20], esenciální enzym pro syntézu nukleových kyselin.

Obrázek 5: Schéma aktivace isoniazidu působením katalasy-peroxidasy KatG. Upraveno podle Janin et al. [21].



Mechanismus rezistence: Nejčastěji mutace katG (40 – 90 % případů), dále mutace inhA, mabA a celé řady dalších genů kódujících cíle zásahu INH. Pro úplný přehled viz např. přehledový článek [22, s. 1180].

Rifampicin (RIF)

Rifampicin patří do skupiny ansamycinových antibiotik, pro něž je charakteristická přítomnost makrocyclického laktamového kruhu, který je tvořen aromatickou částí molekuly, jejíž dvě nesousední místa jsou spojena alifatickým můstkem. RIF je antituberkulotikem s nejvyšší baktericidní aktivitou z používaných antituberkulotik, působí baktericidně na rostoucí i spící mykobaktéria. Zavedení RIF do praxe umožnilo zkrácení léčebných režimů TBC na šest měsíců [22, s. 1179] a v základních terapeutických režimech je podáván po celou dobu léčby. Vysoká lipofilita RIF je výhodná pro pronikání skrz lipofilní stěnu mykobaktéria i přes hematoencefalickou bariéru při léčbě mykobakteriálních meningitid.

Mechanismus účinku: Inhibice prokaryotické DNA dependentní RNA polymerasy. Po navázání na β jednotku tohoto enzymu zabraňuje prodlužování narůstajícího řetězce syntetizované RNA [23].

Mechanismus rezistence: Nejčastěji mutace rpoB, genu kódujícího výše zmíněnou podjednotku. Rezistence je zkřížená s ostatními ansamycinovými antibiotiky.

Ethambutol (EMB)

Ethambutol (EMB), (2*S*)-2-[2-[[*(2S)*-1-hydroxybutan-2-yl]amino]ethylamino]butan-1-ol, je látkou typu jednoduchého aminoalkoholu. Má bakteriostatické účinky. Aktivní je pouze jeho *S,S*(+)- isomer. Farmakoforem se pak zdá být ethylendiaminové uskupení.

Mechanismus účinku: Mechanismus účinku EMB nebyl dosud plně objasněn. Vzhledem ke strukturní podobnosti s D-arabinosou je pravděpodobné, že EMB zasahuje do syntézy arabinanu a jiných od něj odvozených komponent mykobakteriální stěny (arabinogalaktanu, arabinomannanu) [24]. Tento zásah je zprostředkován inhibicí různých druhů arabinosyl transferas [25]. Byly ovšem publikovány i práce popisující jiné účinky EMB na různé druhy mykobakterií, např. inhibici metabolismu RNA [26], inhibici metabolismu fosfolipidů [27] nebo syntézy spermidinu [28].

Mechanismus rezistence: Mutace v oblasti klastru genů embABC kódujícího arabinosyl transferasy EmbA, EmbB a EmbC [29].

Pyrazinamid (PZA)

Chemicky amid kyseliny pyrazinkarboxylové, pyrazin-2-karboxamid. Vzhledem k tomu, že struktura pyrazinkarboxylové kyseliny a potažmo PZA je ústředním motivem této disertační práce, je mu věnována celá kapitola 3.3.

3.2.2 Antituberkulotika druhé linie

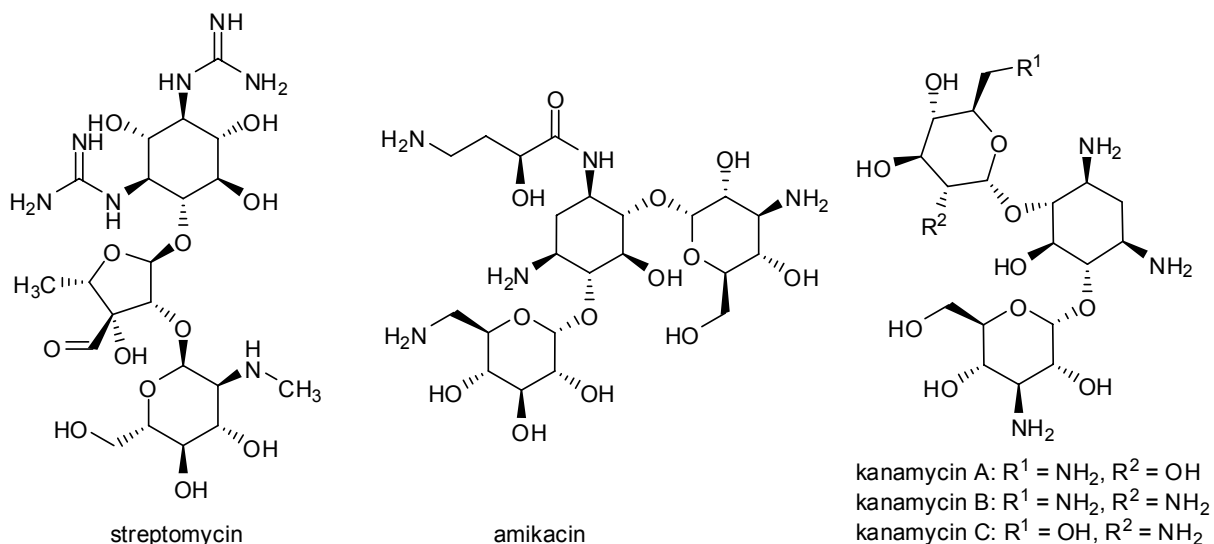
Mezi antituberkulotika druhé linie řadíme látky, jejichž použití k terapii tuberkulózy přináší oproti léčivům první linie určité nevýhody. Těmito nevýhodami mohou být nižší účinnost, výraznější nežádoucí účinky, případně nedostupnost dané látky (např. v rozvojových zemích). Antituberkulotika druhé linie hrají důležitou roli v terapii tuberkulózy rezistentní k některému z léčiv první linie.

Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidová antibiotika jsou trisacharidy až tetrasacharidy vyznačující se přítomností neobvyklých aminosacharidů. Jedná se o přírodní antibiotika izolovaná z kmenů *Streptomyces* nebo *Micromonospora*. Vzhledem k velkému počtu bazických a polárních skupin obsažených v jejich struktuře se špatně vstřebávají ze zažívacího traktu a je tudíž nutné

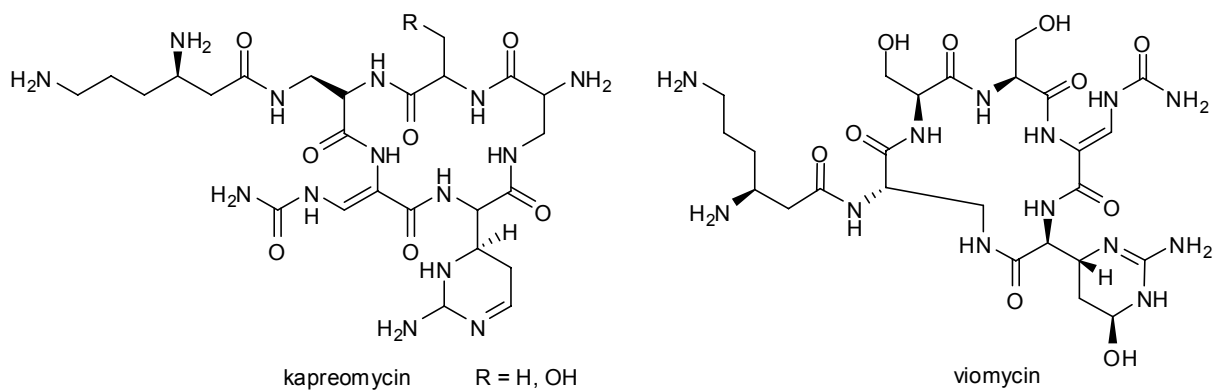
u nich volit podání intravenózní, intramuskulární nebo podání do likvoru [30]. Mechanismem účinku všech aminoglykosidových antibiotik je inhibice bakteriální proteosyntézy prostřednictvím vazby na podjednotku ribosomu 30S [31]. Vzhledem k faktu, že uspořádání eukaryotických ribosomů je odlišné, jsou bakteriální ribosomy vhodným cílem selektivního zásahu. Častými nežádoucími účinky aminoglykosidových antibiotik jsou nefrotoxicita a ototoxicita (poškození sluchového nervu a vestibulárního aparátu) [32].

V terapii tuberkulózy nelézá uplatnění **streptomycin**, **amikacin** a **kanamycin**. Vzhledem k polárnímu charakteru těchto molekul je překvapivé, že jsou schopny pronikat vysoce lipofilní mykobakteriální stěnou. Bylo zřejmeno, že tento průnik se uskutečňuje systémem tzv. porinů, tedy proteinových kanálů sloužících k příjmu hydrofilních nutrientů [33, 34].



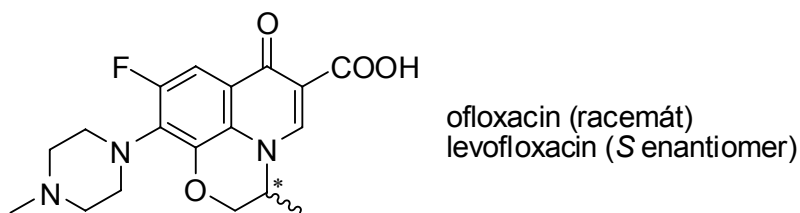
Glykopeptidová antibiotika

Glykopeptidová antibiotika jsou přírodní antibiotika izolovaná z rodu *Streptomyces*. Stejně jako v případě aminoglykosidů se pro svou polaritu nevstřebávají ze zažívacího traktu a jsou proto určena k parenterálnímu podání. Rovněž nežádoucí účinky jsou typické pro léčiva peptidové povahy – ototoxicita a nefrotoxicita. V léčbě tuberkulózy nachází uplatnění **kapreomycin**, **viomycin** [21] a **enviomycin** [35]. Mechanismem účinku je rovněž inhibice proteosyntézy, i když molekulární interakce s ribosomem je od aminoglykosidových antibiotik odlišná [36]. Vzhledem k objemnosti molekuly je pochopitelné, že látky tohoto typu vykazují synergistický účinek s léčivými narušujícími stavbu mykobakteriální stěny [37].



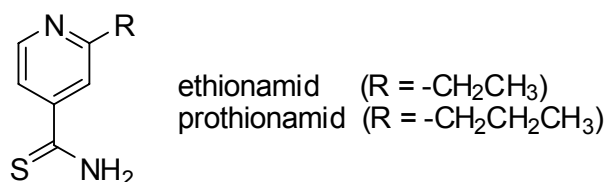
Fluorochinolony

Ačkoli fluorochinolony nejsou oficiálně registrovány jako antituberkulotika, již nyní hrají významnou roli v terapii MDR tuberkulózy. Jedná se však spíše o starší ofloxacin a levofloxacin [47, 48]. Novější chinolony v procesu klinického hodnocení jsou uvedeny v kapitole 3.2.3.



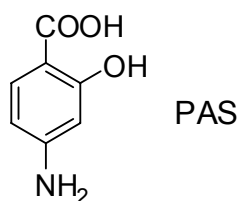
Thioamidy isonikotinové kyseliny a jiné thioamidy

Ethionamid (thioamid kys. 2-ethylisonikotinové) a **prothionamid** (thioamid kys. 2-propylisonikotinové) mají podobný mechanismus účinku jako isoniazid (INH) – jejich cílovou strukturou je stejně jako v případě INH protein InhA (enoyl ACP reduktasa) [38]. Ethionamid i prothionamid jsou proléčiva, která jsou aktivována mykobakteriální flavoproteinovou monooxygenasou (tj. FAD obsahující oxidasou) označovanou jako EtaA [39, 40]. Ta tato léčiva oxiduje na *S*-oxid a dále přes stádium reaktivní sulfinové kyseliny na 2-ethyl resp. 2-propyl-4-amidopyridin. Právě *S*-oxid by mohl být nukleofilem napadajícím různé buněčné struktury (enzymy). Zdá se, že tento mechanismus aktivace je společný všem antituberkulotikům obsahujícím thioamidovou skupinu, neboť oxygenasa EtaA oxiduje také thiocetazon neboli (*E*)-*N*-{4-[(2-karbamothioylhydrazono)methyl]fenyl}acetamid, thiobenzamid a isothionikotinamid [40] – obsoletní antituberkulotika thioamidové struktury. To je příčinou zkřížené rezistence mezi antituberkulotiky této struktury.



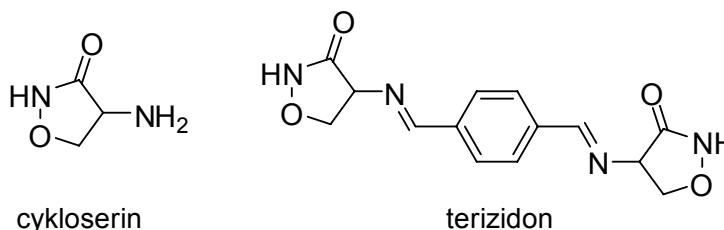
Kyselina *para*-aminosalicylová (PAS)

Kyselina *p*-aminosalicylová byla jako antituberkulotikum používána od roku 1946 [41] a v určité době byla považována i za antituberkulotikum první linie [42]. Dnes se však pro nutnost vysokých terapeutických dávek a velké riziko vzniku rezistence ve vyspělých zemích nepoužívá. Kvůli nízkým nákladům na výrobu však stále hraje určitou roli v rozvojových zemích [43]. Mechanismus účinku není přesně znám. Může se jednat o interferenci s biosyntézou kyseliny listové (inhibice thymidylát reduktasy) na základě strukturní podobnosti s *p*-aminobenzoovou kyselinou [44] nebo o interakci s metabolismem železa v mykobakteriální buňce na základě chelatačních vlastností PAS [43].



Cykloserin a terizidon

D-alanin je klíčovou složkou pentapeptidu tvořícího peptidoglykan bakteriální buněčné stěny. Cykloserin je cyklickým analogem alaninu, proto kompetičním mechanismem zasahuje do syntézy tohoto peptidoglykanového skeletu. Děje se tak inhibicí enzymů D-alanin-racemasy a D-alanin:D-alanin-ligasy [45]. Z posledních dat vyplývá, že inhibice D-alanin racemasy by měla být dominantním mechanismem účinku [46]. Terizidon svou strukturou představuje zdvojenou molekulu cykloserinu.



3.2.3 Antituberkulotika v klinických studiích

Následující tabulka zobrazuje látky, které se nacházejí v různých fázích klinického zkoušení jako antituberkulotika. Zahrnuje nové látky přímo vyvíjené jako antituberkulotika, struktury nové generace odvozené od těchto nových antituberkulotik a látky s původně jinou indikací (antibiotika, chemoterapeutika) nyní testované jako antituberkulotika. Jsou zde však zobrazeny i klinické studie s již zavedenými antituberkulotiky, které mají za cíl zhodnotit jejich prospěšnost v jiných podmínkách (např. jiné terapeutické režimy, terapie rezistentních forem). Stav je aktuální k září 2011.

Tabulka 2: Probíhající klinické studie antituberkulotik, stav v září 2011. Převzato a upraveno podle [47]. Aktualizováno dle [35].

	Látka	Druh studie	Cílová struktura	Fáze
Diarylchinoliny	TMC207	nová látka	ATP syntasa	II -III
	TMC207 pro MDR-TBC	nová látka	ATP syntasa	II
Pyrroly	Sudoterb (LL3858)	nová látka	neznámý	II
Ethylendiaminy	SQ109	nová látka	neznámý	I
Nitroimidazoly	metronidazol	nová indikace	neznámý pro TBC	II
	OPC-67683	nová generace	syntéza lipidů a proteinů	II - III
	PA-824	nová generace	syntézy lipidů a proteinů	II - III
1,3-Oxazolidinony	Linezolid	nová indikace	syntéza proteinů	II
	PNU100480	nová generace	syntéza proteinů	I
	AZD5847	nová generace	syntéza proteinů	I
Fluorochinolony	gatifloxacin	nová indikace	DNA gyrasa	III
	moxifloxacin	nová indikace	DNA gyrasa	III
	DC-159a	nová látka	DNA gyrasa	prekl.
Ansamyciny	rifampicin *	zavedené anti-TBC	RNA polymerasa	I
	rifapentin *	zavedené anti-TBC	RNA polymerasa	II-III

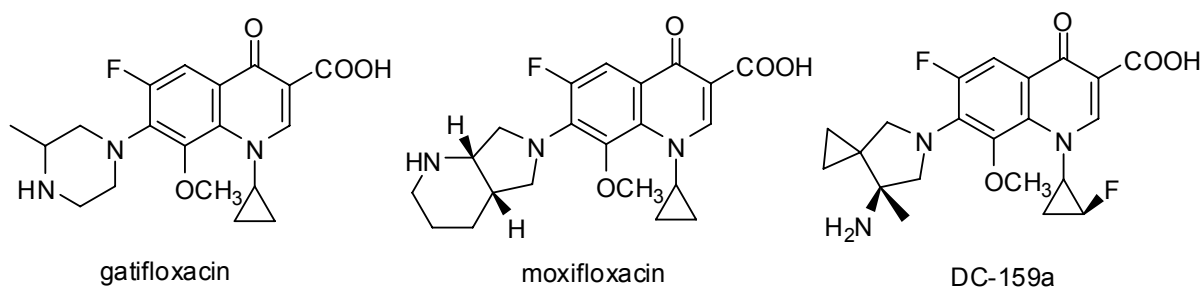
*) studie s novým vysokým dávkováním

Následující pasáže uvádějí některé podrobnosti nejvýznamnějších skupin nových antituberkulotik v klinickém vývoji.

Fluorochinolony

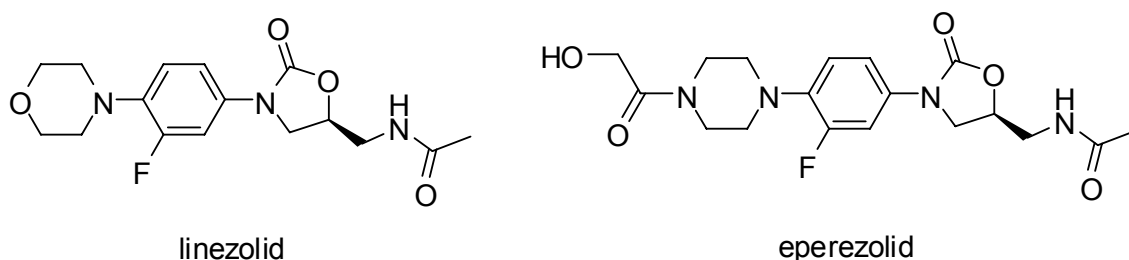
Ačkoli fluorochinolony nejsou oficiálně registrovány jako antituberkulotika, již nyní hrají významnou roli v terapii MDR tuberkulózy. Jedná se však spíše o starší ofloxacin a

levofloxacin [47, 48]. Novější deriváty **8-methoxyfluorochinolonů** jsou zkoušeny v terapii nerezistentních kmenů mykobaktérií. Z dosavadních výsledků vyplývá, že náhrada ethambutolu nebo isoniazidu ze základního terapeutického režimu za **moxifloxacin** či **gatifloxacin** zkracuje dobu potřebné terapie z 6 – 9 měsíců na čtyři měsíce [49, 50, 51]. DC-159a je fluorochinolon nové generace pro terapii respiračních chorob s dobrou antimykobakteriální aktivitou [52].

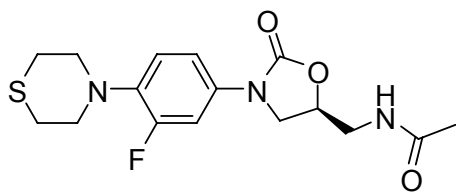


1,3-Oxazolidinony

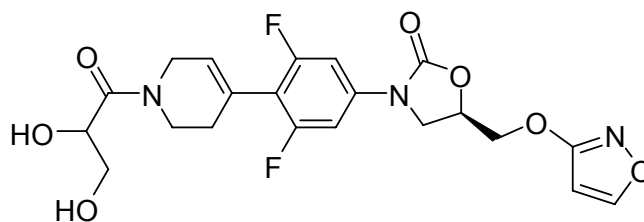
Oxazolidinony patří mezi syntetická chemoterapeutika. Mechanismem účinku je inhibice syntézy proteinů. Narozdíl od ostatních antibioticky účinných látek s tímto efektem, které blokují elongaci vznikajícího peptidového řetězce, oxazolidinony blokují vytvoření iniciačního komplexu 70S vazbou na jednotku 50S poblíž místa pro připojení jednotky 30S [53, 54]. V současnosti je jediným registrovaným léčivem z této skupiny **linezolid**, obchodovaný jako Zyvox (Pfizer). Spektrum účinku zahrnuje především grampozitivní bakterie, včetně rezistentních na běžná chemoterapeutika – např. MRSA – meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* [55]. Linezolid nachází uplatnění v terapii MDR tuberkulózy [56, 57].



Další deriváty 1,3-oxazolidinonů jsou ve vývoji. Látka **PNU-100480**, poprvé připravena v roce 1996 [58], je v současné době v produktovodu společnosti Pfizer [59]. V porovnání s linezolidem vykázal lepší antimykobakteriální aktivitu při stejné snášenlivosti [60]. Další derivát **AZD5847** je vyvíjen společností AstraZeneca [47].



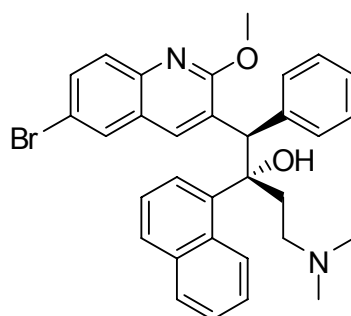
PNU-100480



AZD5847

Diarylchinoliny – TMC 207

TMC 207 je nejúčinnějším z řady diarylchinolinů (DIARQs) připravených v roce 2004 [61, 62]. Mechanismem účinku je inhibice podjednotky c mykobakteriální ATP synthasy [62, 63]. Vzhledem k velké rozdílnosti mykobakteriální formy tohoto enzymu od eukaryotické obdoby je tato struktura ideálním místem selektivního zásahu vůči mykobaktériím. TMC207 má velmi dobrý sterilizační účinek, který byl v některých modelech tuberkulózy až stokrát větší než v případě trojkombinace PZA, RIF, INH [64]. Velice dobrá je i účinnost proti MDR mykobaktériím a TMC207 nevykazuje skříženou rezistenci s ostatními antituberkulotiky první volby [62, 65].



TMC207

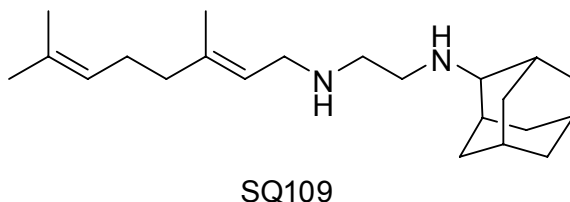
(1*R*,2*S*)-1-(6-brom-2-methoxychinolin-3-yl)-4-(dimethylamino)-2-(naft-1-yl)-1-fenylbutan-2-ol

Ethylendiaminy – SQ109

Ethylendiamin SQ109 byl syntetizován jako součást širší knihovny analogů ethambutolu (EMB) [66] a z této knihovny byl poté vybrán jako nejvhodnější kandidát [67]. Jeho struktura je charakteristická isoprenylovými jednotkami a objemným zbytkem odvozeným od adamantanu. Základní farmakofor EMB, tedy ethylendiamin, je zachován. SQ109 je dobře účinný i proti kmenům rezistentním na INH, RIF a EMB [67]. Z toho lze dovozovat, že ač strukturně vychází z EMB, jeho účinek bude zaměřen na jinou cílovou strukturu. Mechanismus účinku není plně objasněn. SQ109 podléhá velmi rychlé metabolizaci v játrech a je tedy možné, že se ve skutečnosti jedná o proléčivo [68]. Klinické

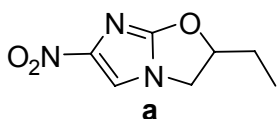
studie fáze I potvrdily dobrou farmakokinetiku a dlouhý poločas, který umožňuje i podávání jednou týdně [69].

Další nová analoga diaminů jsou i nadále publikována [70].

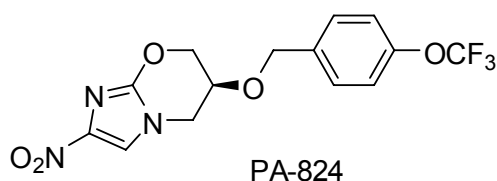


Nitroimidazoly PA-824 a OPC-67683

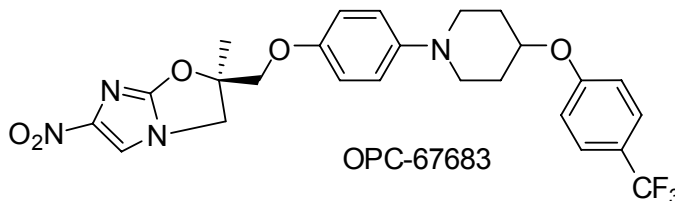
Nitroimidazoly jsou strukturně příbuzné metronidazolu běžně používanému k terapii anaerobních infekcí. Antimykobakteriální aktivita byla nejprve objevena u nitroimidazofuranů, nicméně tyto látky, včetně vůdčí struktury (**a**) byly mutagenní. [71]. Nitroimidazo[2,1-*b*]oxaziny, jejichž vůdčí strukturou se stala látka **PA-824**, při zachování podobné antimykobakteriální aktivity mutagenitu neprokázaly [72]. PA-824 účinkuje na rezistentní formy mykobaktérií a nebyla u něj prokázána zkřížená rezistence s žádným jiným antituberkulotikem [72]. Je baktericidní a účinkuje i proti dormantním mykobaktériím [73]. SAR vztahy ve skupině nitroimidazo[2,1-*b*]oxazinů a jiných nitroimidazolů byly popsány v přehledovém článku [74].



2-ethyl-6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]oxazol
mutagenní



2-nitro-6,7-dihydro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazinový
skelet



6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]oxazolový skelet

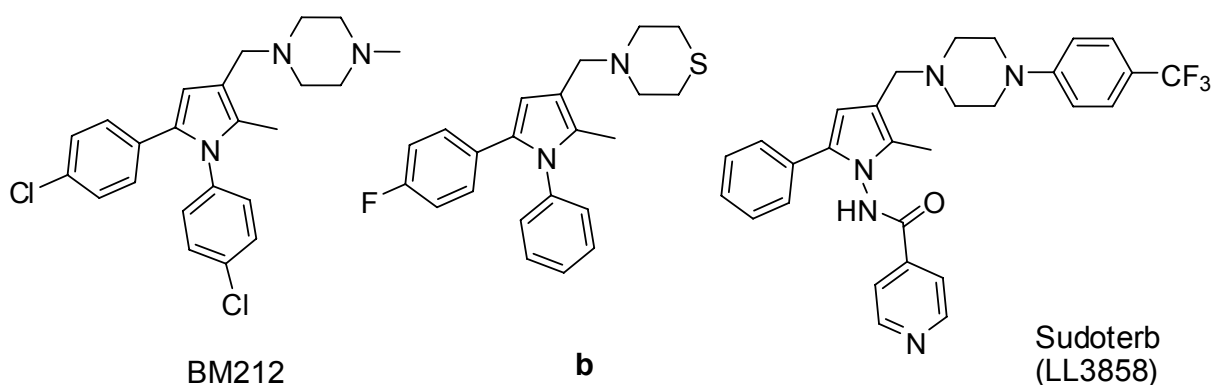
Další nitroimidazolový derivát v klinickém hodnocení, látka **OPC-67683**, má na rozdíl od předchozí řady k nitroimidazolovému kruhu připojen pouze pětičlenný cyklus – oxazol. OPC-67683 je tak představitelem a zároveň vůdčí strukturou 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-

b]oxazolů. SAR v této skupině byly rovněž publikovány [76]. Účinkuje taktéž na rezistentní mykobaktéria a ani u něj se zpravidla nevyskytuje zkřížená rezistence s ostatními antituberkulotiky [77].

Mechanismus obou zmíněných látek je stejný a platný zřejmě pro celou skupinu nitroimidazolových antituberkulotik. Obě vůdčí struktury, PA-824 i OPC-67683 jsou proléčivý, jejichž nitro skupina je redukována mykobakteriálními enzymy za vzniku vícero reaktivních dusíkatých intermediátů. Tyto intermediáty poté reagují s jinými enzymatickými systémy a narušují syntézu lipidů (tvorbu mykobakteriální stěny) a proteinů mykobaktéria [75, 77]. Mechanismus účinku PA-824 na nedělicí se dormantní mykobaktéria je pak zprostředkován intracelulárním uvolňováním oxidu dusnatého NO [78].

Pyrolly – Sudoterb (LL3858)

První série antimykobakteriálně účinných pyrrolů byla publikována na konci devadesátých let minulého století. Látka s označením BM212 byla účinná i proti rezistentním mykobaktériím a některým atypickým mykobaktériím (MOTTs) [79]. Optimalizační studie jiného autorského kolektivu dále vedly k látkám podobné struktury a účinku (**b**) [80]. Zatím nejslibnější látkou ze skupiny antimykobakteriálně účinných pyrrolů je **Sudoterb (LL3858)** patřící do skupiny pyrrolů obsahujících ve své struktuře motiv isoniazidu [81]. Mechanismus účinku antimykobakteriálních pyrrolů není dosud znám [47].



3.2.4 Potencionální nové cíle pro farmakoterapeutický zásah

S poznáním genomu *M. tuberculosis* a identifikaci jednotlivých genů a jejich funkcí [7] došlo k výraznému posunu v poznání fyziologických a metabolických procesů mykobaktérií. Proteomickou analýzou je tak možné identifikovat vhodné buněčné struktury a enzymy, které by se mohly stát selektivními místy farmakoterapeutického zásahu. Přehled

těchto nových potencionálních cílů přesahuje rámec této práce, čtenáře je však možno odkázat na přehledový článek [35] z roku 2011 shrnující poznání v této oblasti.

3.2.5 Terapeutická strategie a standardní terapeutické režimy

Standardy pro terapii tuberkulózy jsou zpracovávány a zveřejňovány mimo jiné WHO. Posledním uceleným dokumentem WHO v této oblasti je čtvrté vydání standardů Treatment of tuberculosis: guidelines [14]. Z tohoto dokumentu čerpá i tato kapitola. Z mezinárodních standardů WHO pak vycházejí jednotlivé národní standardy, které respektují epidemiologickou situaci TBC v dané lokalitě a často také dostupnost a farmakoekonomiku jednotlivých léčiv.

WHO používá k popisu terapeutických režimů akronymy vytvořené z názvů jednotlivých antituberkulotik. Z důvodu konzistentnosti této kapitoly s dokumenty WHO přejímáme zde toto označení:

- H = isoniazid; R = rifampicin; Z = pyrazinamid; E = ethambutol; S = streptomycin
- číslovka před zkratkami léčiv udává dobu trvání léčby v měsících

Terapie tuberkulózy se skládá vždy z kratší **intenzivní fáze**, ve které se obvykle používá čtyřkombinace léčiv, následovaná **pokračovací fází** (obvykle 2 léčiva) různé délky trvání dle vnímavosti patogenu a klinického projevu infekce (aktivní / latentní).

Standardním doporučeným režimem pro pacienty s primoinfekcí TBC je režim **2HRZE/4HR** – tedy dvouměsíční intenzivní fáze isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol následovaná čtyřměsíční pokračovací fází isoniazid, rifampicin. V oblastech s vysokou mírou rezistence vůči isoniazidu a kde nejsou dostupné testy citlivosti na isoniazid se doporučuje ponechání ethambutolu během pokračovací fáze, tedy režim **2HRZE/4HRE**. Vždy pokud je to možné, mělo by být upřednostňováno dávkování jednou denně před dávkováním třikrát týdně. Dávkování třikrát týdně je možno použít jen v odůvodněných případech a pokud je podání každé dávky přímo monitorováno.

U pacientů s pozitivním nálezem ve sputu by mělo být vyšetření sputa zopakováno po ukončení intenzivní fáze terapie, tedy po dvou měsících. Při přetrvávající pozitivitě opakujeme test po dalším měsíci (celkem po ukončeném 3. měsíci terapie). V případě pozitivitě je doporučováno provedení vyšetření citlivosti a úprava režimu dle jeho výsledků.

U pacientů s předchozí léčbou TBC v anamnéze se doporučuje vždy provést vyšetření citlivosti patogenu alespoň vůči isoniazidu a rifampicinu, lépe pak pro všechna antituberkulotika první volby. Kde takovéto vyšetření citlivosti není dostupné, měl by být nasazen empirický režim **2HRZES/1HRZE/5HRE**.

3.2.6 Terapie rezistentních forem tuberkulózy

V případě multirezistentních forem TBC (MDR-TB) je velká část odpovědnosti za léčbu pacienta přesunuta na ošetřujícího lékaře. WHO publikovala [14] obecná doporučení pro terapii MDR-TB, dle kterých jsou sestavovány terapeutické plány pro konkrétní oblast (např. národní plány) na základě epidemiologické situace, případně individuální plány pro konkrétního pacienta. Základem úspěšně sestaveného individuálního plánu je samozřejmě kvalitní vyšetření citlivosti patogenu.

Dle účinnosti a užitečnosti v terapii MDR-TB jsou léčiva rozdělena do pěti kategorií, které uvádí Tabulka 3. Z této palety léčiv se sestavuje léčebný plán podle následujících pravidel:

- použít nejméně čtyři různé látky, které prokážou účinnost vůči izolátu
- nepoužívat látky, které navzájem vykazují zkříženou rezistenci
- používat pouze bezpečná léčiva – vyhnout se léčivům s pochybnou kvalitou nebo s nežádoucími účinky, které by byly pro konkrétního pacienta nebezpečné
- vybrat léčiva postupně z kategorií 1 až 3 – přitom vybrat všechny účinné látky z kategorie 1, doplnit jedním aminoglykosidem nebo polypeptidovým léčivem ze skupiny 2, zahrnout jeden fluorochinolon ze skupiny 3
- pokud předchozí postup nevedl k nalezení alespoň 4 účinných látek, doplnit léčivy z kategorie 4
- pokud z kategorií 1-4 nebyla vybrána alespoň 4 účinná léčiva, přidat 2 další z kategorie 5

Výsledné terapeutické režimy pro MDR-TB v praxi pak obsahují pět až sedm léčiv. Doba podávání injekčního antituberkulotika ze skupiny 2 vymezuje v případě MDR-TB režimů trvání intenzivní fáze. Ta by měla trvat minimálně 6 měsíců a zároveň minimálně 4 měsíce poté, co se pacient stal a setrval negativní dle vyšetření sputa nebo jiné kultivace. Celková minimální doporučená doba léčby MDR-TB je 18 měsíců, v chronických případech

s rozsáhlým poškozením plic až 24 měsíců. Nezbytností je samozřejmě důsledný monitoring průběhu léčby.

Tabulka 3: Rozdělení léčiv pro terapii MDR-TB dle WHO. Uvedené zkratky léčiv jsou používány v materiálech WHO. Upraveno podle [14].

1. skupina – p. o. léčiva první volby	<ul style="list-style-type: none"> • pyrazinamid (Z) • ethambutol (E) • rifabutin (Rfb)
2. skupina – parenterální léčiva	<ul style="list-style-type: none"> • kanamycin (Km) • amikacin (Am) • kapreomycin (Cm) • streptomycin (S)
3. skupina – fluorochinolony	<ul style="list-style-type: none"> • levofloxacin (Lfx) • moxifloxacin (Mfx) • ofloxacin (Ofx)
4. skupina – p. o. bakteriostatická léčiva 2. linie	<ul style="list-style-type: none"> • <i>p</i>-aminosalicylová kys. (PAS) • cykloserine (Cs) • terizidon (Trd) • ethionamid (Eto) • prothionamid (Pto)
5. skupina – léčiva s nejasnou rolí v terapii MDR-TB	<ul style="list-style-type: none"> • klofazimin (Cfz) • linezolid (Lzd) • amoxicilin/klavulanát (Amx/Clv) • thioacetazon (Thz) • imipenem/cilastatin (Ipm/Cln) • isoniazid ve vysoké dávce 16-20 mg/kg/den • klarithromycin (Clr)

3.3 Pyrazinamid

Pyrazinamid je bílá krystalická látka s teplotou tání 190-191 °C [82]. Syntéza pyrazinamidu byla poprvé popsána v roce 1939 v patentu pocházejícím z laboratoří německé firmy E. Merck [83]. Pyrazinamid a jeho *N*-substituované deriváty (substituovaná amidová funkce) zde byly zamýšleny jako potencionální analeptika. K objevu antimykobakteriálních vlastností pyrazinamidu došlo o více než dvacet let později, v roce 1952 [84, 85]. Cesta vedoucí k poznání PZA jako antituberkulotika přitom počala objevem antituberkulotické aktivity nikotinamidu, tedy amidu kys. pyridin-3-karboxylové [86]. Všechny tyto prvotní studie byly provedeny *in vivo* na myším modelu tuberkulózy.

3.3.1 Mechanismus účinku PZA

Ačkoli od 50. let 20. století byl PZA jedním z nejužívanějších antituberkulotik, až do nedávné doby bylo o jeho mechanismu účinku známo velmi málo a určité pochybnosti dosud přetrvávají. PZA jako proléčivo proniká pasivní difuzí do mykobakteriální buňky, kde je působením pyrazinamidasy/nikotinamidasy přeměněn na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA), vlastní účinnou látku. Aktivity pyrazinamidasy/nikotinamidasy se přitom zdá být v přímo úměrném vztahu k vnímavosti daného mykobaktéria vůči PZA [87]. Mechanismus účinku vlastní POA pak vysvětluje všeobecně uznávaná hypotéza autorů Zhang a kol. [88]. Uvolněná POA vystupuje z buňky do extracelulárního prostoru pasivní difuzí a aktivním (tj. energii spotřebovávajícím) efluxním mechanismem. Na tomto místě je nutno poznamenat, že u *M. tuberculosis* je tento efluxní mechanismus v porovnání s ostatními druhy mykobaktérií málo aktivní, což přispívá k unikátní vnímavosti *M. tuberculosis* vůči PZA [89]. V případě kyselého pH extracelulárního prostředí se určitá malá část POA ($pK_a = 2,9$) vyskytuje v protonizované (neutrální) podobě HPOA – výpočet na základě Handerson-Hasselbalchovy rovnice viz **Tabulka 4**. HPOA jako neutrální molekula snadno proniká pasivní difuzí do intracelulárního prostoru (funguje tedy jako přenašeč protonu). U *M. tuberculosis* dochází v důsledku nízké aktivity efluxního mechanismu k akumulaci POA v plazmě. Acidifikace plazmy pak může vést k inaktivaci různých vitálních enzymů mykobaktéria. Změna gradientu pH mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem vede k závažnému ovlivnění membránových transportních mechanismů (pro něž je gradient pH hnací silou) [88].

Tabulka 4: Poměr HPOA/POA- v závislosti na pH

pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
HPOA / POA- (%)	0,788	0,251	0,079	0,025	0,008	0,003

Pasivní difuze POA je samozřejmě nespecifický mechanismus, který je sdílen s mnoha látkami podobné povahy (slabé organické kyseliny). Účinek POA na *M. tuberculosis* je tak očividně závislý na deficienci specifického efluxního mechanismu pro tuto kyselinu. V souladu s tímto předpokladem je i známý fakt, že mykobaktéria s nízkou úrovní metabolické aktivity jsou k působení PZA/POA vnímavější [90], neboť snížená metabolická aktivita znamená i snížené množství dostupné energie využitelné k uskutečňování specifického efluxu POA. V souladu s předcházejícím tvrzením jsou i pozorování o tom, že různé látky negativně zasahující do energetického metabolismu buňky zvyšují účinek PZA. Tento efekt byl pozorován například u *N,N'*-dicyclohexylkarbodiimidu (DCCD, inhibitoru F1F0 ATPasy) [88]; 2,4-dinitrofenolu a kyanidu [91] a celé skupiny diarylchinolinů (viz kapitola 3.2.3), které jako potencionální nová antituberkulotika rovněž inhibují F0F1 ATPasu a mohou tak těžit ze synergismu účinku s PZA.

Nejčastějším mechanismem rezistence *M. tuberculosis* vůči PZA je ztráta enzymatické aktivity pyrazinamidasy/nikotinamidasy zapříčiněná mutacemi v genu *pncA* [92, 93] kódujícím tuto amidasu.

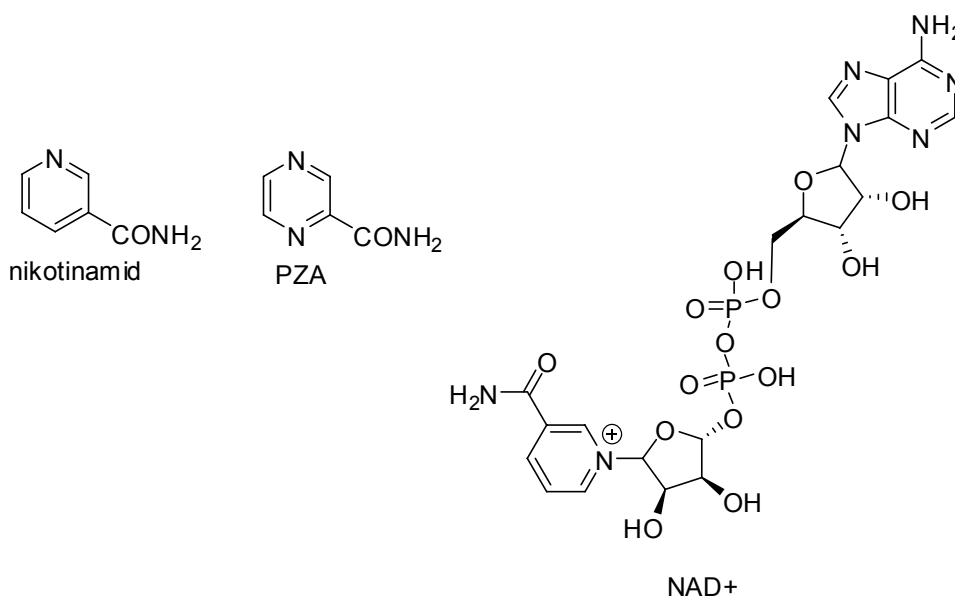
3.3.2 Možné specifické účinky pyrazinamidu a kys. pyrazinkarboxylové

Teorie uvedené v předchozí kapitole vysvětlovaly mechanismus účinku PZA/POA jako nespecifický děj založený převážně na fyzikálně-chemických vlastnostech POA. Tato teorie je podporována faktem, že se doposud nepodařilo izolovat mykobakteriální mutanty rezistentní vůči POA [92], což by mohlo znamenat, že pro POA neexistuje konkrétní buněčný cíl. Je ovšem také možné, že cíl POA sice existuje, ale je natolik důležitým systémem, že jeho mutace vede k životu neschopným jedincům. V průběhu výzkumu PZA, POA a jejich derivátů bylo ovšem vysloveno několik teorií beroucích v potaz i možný specifický účinek těchto látek na konkrétní mykobakteriální subcelulární cíl. Následuje stručný přehled těchto teorií.

PZA/POA jako falešný analog nikotinamidu v syntéze NAD⁺

Nikotinamid, tj. amid pyridin-3-karboxylové kyseliny, je spolu s kyselinou nikotinovou jednou z možných výchozích látek v syntéze NAD⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid). Pyrazinamidasa/nikotinamidasa (PncA) je prvním enzymem této syntetické cesty a PZA i nikotinamid je jí shodně metabolizován na příslušné kyseliny. Tato fakta vedla k domněnce, že PZA/POA by mohl fungovat jako falešný analog nikotinamidu/nikotinové kyseliny a buďto inhibovat některý z enzymů této metabolické syntetické dráhy nebo vést k tvorbě nefunkčních analogů NAD⁺. Toto tvrzení však dosud nebylo prokázáno [87]. Situace je navíc komplikovaná tím, že u mykobaktérií se stejně jako u mnohých jiných prokaryotických organismů kromě prezentované biosyntézy NAD⁺ z nikotinamidu či nikotinové kyseliny vyskytuje i syntéza NAD⁺ *de novo*, vycházející z aminokyselinových prekurzorů [94].

Obrázek 6: NAD⁺ a strukturní podobnost nikotinamidu a pyrazinamidu. Možný mechanismus účinku.



Deriváty PZA/POA jako inhibitory Fatty Acid Synthase I

Fatty Acid Synthase I (FAS I) je komplex enzymů podílejících se na syntéze vyšších mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Tyto kyseliny jsou esenciální složkou obalů mykobaktérií.

Inhibice biosyntézy mastných kyselin byla jako mechanismus účinku navržena pro 5-chlorpyrazinamid (5-Cl-PZA) autory Zimhony a kol. [95], kteří pozorovali, že rezistence

různých mykobaktérií vůči 5-Cl-PZA je vázána na plasmidový gen *fas1*, kódující FAS I. Kromě 5-Cl-PZA byla inhibice FAS I v této studii pozorována i u samotného PZA i POA, i když pouze ve vysokých koncentracích (1000, resp. 1500 µg/ml). Boshoff a kol. [96] toto pozorování ověřovali i na izolovaném enzymu FAS I a aktivitu potvrdili pouze pro 5-Cl-PZA, nikoliv PZA samotný. Zimhony, Ngo a kol. posléze publikovali FAS I inhibiční aktivitu POA a jejích esterů, především *n*-propylesteru [97, 98]. Jak vidno z předchozích citací, informace ohledně aktivity vůči mykobakteriální FAS I jsou někdy protichůdné, nicméně se zdá, že tento mechanismus účinku můžeme potvrdit alespoň u některých derivátů PZA.

Posledním pokrokem v této oblasti je studie z června 2011 [99], která pomocí NMR techniky potvrdila vazbu PZA i POA na izolovanou FAS I. Z této studie vyplynuly některé zajímavé souvislosti. Vazba PZA i POA byla sice slabá, ale jednoznačná, a bylo určeno i přesné vazebné místo. Přesněji vazebná místa, která byla odlišná pro PZA a POA. PZA soutěžil o vazebné místo s NADPH - kofaktorem FAS. Vynořuje se tak opět motiv strukturní podobnosti PZA a nikotinamidu. Rovněž je potvrzeno, že jak PZA tak POA inhibují mykobakteriální FAS I, a to každá z těchto látek odlišným mechanismem. Bude zajímavé dále sledovat, zda autoři prověří stejnou NMR metodou i vazbu jiných derivátů PZA, např. 5-Cl-PZA.

PZA/POA jako inhibitor trans-translace

Trans-translace [100, 101] je proces kontroly kvality translace vyskytující se ve všech eubakteriích a v některých eukaryotických organelách. Pokud z nějakého důvodu (např. zlom v mRNA, větvení mRNA, výskyt neobvyklých kodonů) dojde k přerušení translačního procesu (tedy procesu přepisu mRNA do podoby řetězce aminokyselin), překládající ribosom zůstává asociován s poškozenou mRNA a částečně vzniklým defektním proteinem. Trans-translace je mechanismus umožňující uvolnění a recyklaci tohoto ribosomu spojenou s degradací defektního proteinu. Klíčovou roli v procesu trans-translace hraje tmRNA (transfer-messenger RNA), která plní informační i přenašečovou funkci [102]. Stručně popsáno, tmRNA přináší (přenašečová funkce) alanin, který je navázán na konec defektního proteinového řetězce. Posléze tmRNA vytěsňuje z ribosomu původní defektní mRNA a sama se stává templátem, který ribosom začne překládat (informační funkce). Translací tmRNA je k defektnímu proteinu připojena sekvence označující tento protein jako určený k degradaci. Samotná tmRNA potřebuje pro svou funkci několik dalších proteinů.

Nová studie publikovaná v srpnu 2011 v prestižním časopise Science [103] popisuje inhibiční účinek PZA (přesněji POA) na trans-translační proces *Mycobacterium tuberculosis*. Studie prokazuje, že POA (nikoliv však PZA) se váže na ribosomální protein **RpsA**. Funkcí tohoto proteinu je zprostředkování prvotní vazby mezi ribosomem a tmRNA. Po navázání POA na ribosomální RpsA je tak znemožněno připojení tmRNA k ribosomu a celý trans-translační proces je inhibován. Autoři tuto teorii dále podkládají zjištěním, že několik málo mutantů *Mycobacterium tuberculosis*, které byly rezistentní k PZA a zároveň neměli mutaci v genu pro pyrazinamidasy (*pncA*), měly mutace v genu *rpsA*.

Trans-translace je zásadním obranným mechanismem bakterií a je pochopitelné, že jeho důležitost se projevuje především v podmínkách, které mohou vést k chybám transkripčních a translačních procesů. Takovými podmínkami vedoucími k buněčnému stresu mohou být i nedostatek živin, hypoxie, kyselé pH, případně přítomnost inhibitorů energetického metabolismu. To jsou přesně ty podmínky, ve kterých je obecně známa vyšší aktivita PZA. Autoři studie [103] proto věří, že tato teorie vysvětluje účinky PZA lépe než dosud všeobecně uznávaná teorie autorů Zhang kol. o nespécifickém účinku POA. Minimálně je takto určen další specifický cíl pro POA – ribosomální protein RpsA.

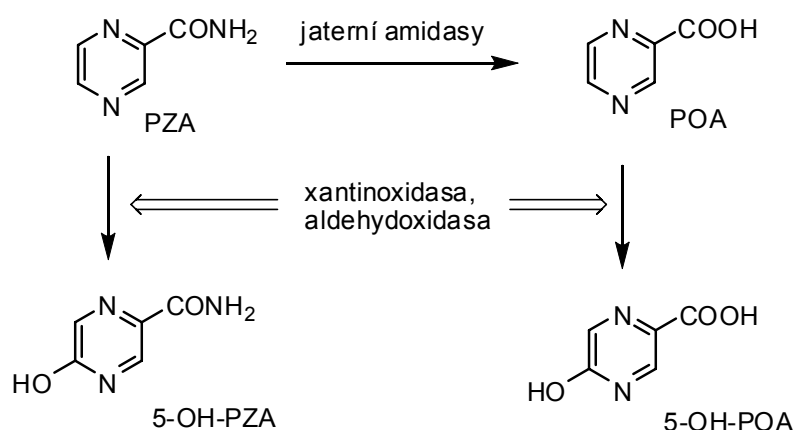
3.3.3 Farmakokinetika pyrazinamidu

Farmakokinetika každého léčiva je podstatnou částí (podmínkou) jeho farmakodynamického účinku. I sebeúčinnější látka v *in vitro* podmínkách nemůže uspět jako léčivo, pokud není schopná se v terapeutických koncentracích dostat na předpokládané místo svého působení. Názorným příkladem je pyrazinkarboxylová kyselina (POA), která svou *in vitro* antimykobakteriální aktivitou vysoce převyšuje samotný PZA, v podmínkách *in vivo* je ovšem neúčinná. V následujících odstavcích proto následuje stručný popis osudu PZA po podání. Farmakokinetikou léčiva rozumíme jeho **a**dsorpci, **d**istribuci, **m**etalismus a **e**xkreci – soubor těchto dějů proto bývá v odborné literatuře často označován jako ADME.

Obvyklá denní terapeutická dávka PZA pro dospělého činí podle nejnovějšího doporučení WHO [14] 20-30 mg/kg denně, případně 30-40 mg/kg třikrát týdně. Obvykle tedy 2 g denně pro pacienty nad 50 kg tělesné hmotnosti, resp. 1,5 g denně pro pacienty s vahou pod tímto limitem. Po perorálním podání se PZA rychle vstřebává a po podání nalačno dosahuje maximální koncentrace v plazmě ($c_{MAX} = 53,4 \pm 10,4 \mu\text{g/ml}$) po 1-2 hod ($T_{MAX} = 1,43 \pm 1,06 \text{ hod}$) [104]. Poločas PZA byl stanoven na 3,5 hod u dětí a 6 hod u dospělých [105], tato studie byla provedena na lidech s klinicky manifestovanou infekcí TBC.

Asi jedna třetina podané dávky PZA se rychle metabolizuje v játrech na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA) a je vyloučena z organismu [106]. PZA i POA jsou dále oxidovány xantinoxidasou a aldehydoxidasou na 5-OH-PZA, resp. 5-OH-POA. Není proto překvapením, že allopurinol, běžně užívaný inhibitor xantinoxidasy, snižuje rychlost eliminace PZA [106, 107]. Exkrece PZA a jeho metabolitů se odehrává převážně ledvinami, 70 % podané dávky se vyloučí močí jako POA, 5-OH-POA, 5-OH-PZA a pouze 3 % jako nezměněný PZA.

Schéma 1: Metabolismus pyrazinamidu



3.3.4 Nežádoucí účinky pyrazinamidu

Nejčastějšími nežádoucími účinky PZA jsou poškození jater v důsledku jeho hepatotoxicity a arthralgie, případně až akutní ataka dny, v důsledku zvýšených hladin kyseliny močové v plazmě (hyperurikémie) po podávání PZA.

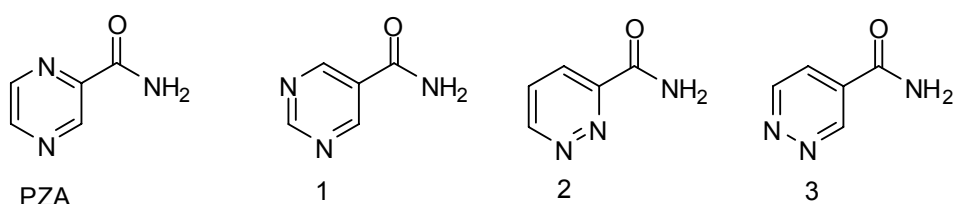
Hyperurikémie jako nežádoucí účinek PZA je způsobena kompeticí PZA s kys. močovou o exkretční systém v tubulech. Tento nežádoucí jev byl předmětem studií již brzy po uvedení PZA do klinické praxe [108] a zájem o tuto problematiku přetrvával [109]. Ačkoli se jedná jistě o nepříjemný problém, neboť se vyskytuje u většiny pacientů léčených PZA, jen málokdy se rozvine do té míry, aby byla ohrožena antituberkulotická medikace (vysazení PZA). Například dle studie [110] provedené v Indii na 50 nemocných s aktivní TBC se zvýšená hladina kys. močové vyskytovala asi v 50 % případů (po šesti až osmi týdnech terapie), ale arthralgické obtíže se vyskytly pouze asi u pětiny z těchto případů (tedy celkově asi u 10 % léčených). Navíc lze tyto obtíže poměrně snadno řešit dostupnou léčbou nesteroidními antiflogistiky, např. kyselinou acetylsalicylovou.

Mechanismus hepatotoxicity PZA nebyl dosud objasněn [111, s.759]. Rizikovými faktory jsou vyšší věk, malnutrice, alkoholismus, HIV infekce a chronická virová hepatitida B a C (HVB, HVC) [112]. Přidání PZA ke kombinaci isoniazid (INH) + rifampicin (RIF) zvýšilo riziko hepatotoxických projevů z 0,8 % na 2 % [113]. Zároveň bylo prokázáno, že INH a jeho toxický metabolit hydrazin zvyšuje v *in vitro* uspořádání citlivost jaterní buněčné linie HepG2 vůči hepatotoxickému působení PZA [114].

3.4 Chemické obměny struktury pyrazinamidu jako snaha o vývoj nových antituberkulotik

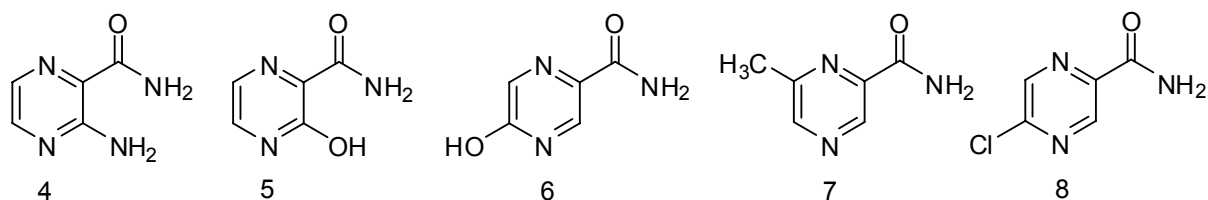
Již záhy po uvedení PZA do klinické praxe v 50. letech 20. století se objevily snahy o přípravu účinnějšího antituberkulotika vycházejícího ze struktury PZA. Vzhledem k neznalosti mechanismu účinku PZA se jednalo o snahy převážně empirické. Následující část této práce vychází z výborného přehledu SAR derivátů PZA prezentovaného v monografii Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery, and Development [111, s. 756-758], který je doplněn informacemi o jiných derivátech PZA s publikovanou antituberkulotickou aktivitou, včetně těch, které byly připraveny na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

3.4.1 Polohové isomerie pyrazinového jádra



Důležitost vlastního pyrazinového jádra pro účinek PZA byla zjištěna v roce 1952 záhy po objevení aktivity PZA. Rogers a kol. [115] otestovali aktivitu ostatních diazinkarboxamidů na myším modelu *in vivo*. Pouze pyridazin-3-karboxamid (**2**) vykázal slabou aktivitu, pyrimidin-5-karboxamid (**1**) a pyridazin-4-karboxamid (**3**) byly neúčinné.

3.4.2 Jednoduché substituce pyrazinového jádra



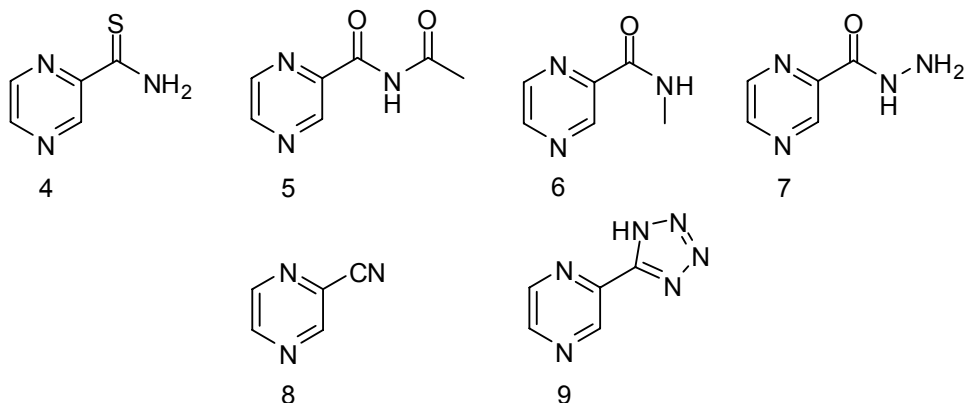
Zavedení aminoskupiny (**4**) a hydroxylové skupiny (**5**) do polohy 3 opět vedlo k derivátům neúčinným na myším modelu (*in vivo*) [115]. Deriváty s aminoskupinou či hydroxyskupinou v poloze 5 nebo 6 byly sice připraveny, ovšem jejich antimykobakteriální aktivita nebyla publikována. Vzhledem k tomu, že 5-hydroxypyrazin-2-karboxamid (**6**) je jedním z hlavních metabolitů PZA (blíže viz 3.3.3), by informace o jeho aktivitě byla jistě zajímavá.

6-Methylpyrazin-2-karboxamid (**7**) perorálně podávaný v potravě myším byl neúčinný [116], nicméně Vontor a kol. [118] u této látky zjistil *in vitro* aktivitu proti *M. tuberculosis H37Rv*.

5-chlorpyrazin-2-karboxamid (5-chlorpyrazinamid, **5-Cl-PZA**, (**8**)) je v jistém smyslu možno považovat za dosud nejúspěšnější strukturální obměnu předlohového PZA. V roce 1998 publikoval Cynamon a kol. [119] důležitou práci, ve které demonstroval aktivitu 5-Cl-PZA, která byla u všech *in vitro* testovaných druhů a kmenů mykobaktérií lepší v porovnání s nesubstituovaným PZA. 5-Cl-PZA účinkoval i na mutanty *M. tuberculosis* rezistentní vůči PZA a rovněž tak na kmeny *M. bovis*, *M. kansasii*, *fortuitium*, *smegmatis* a *avium*, tedy organismy přirozeně rezistentní vůči PZA. Všechny tyto kmeny inhiboval *in vitro* (pH = 5,5) s MIC v rozmezí 8 – 64 µg/ml, což byl v porovnání s PZA (MIC ≥ 2048 µg/ml) výborný výsledek. Vzhledem ke skutečnosti, že 5-Cl-PZA byl účinný i proti organismům s málo aktivní či neaktivní pyrazinamidásou, autoři již v této studii vyjádřili podezření, že 5-Cl-PZA je buďto jako proléčivo aktivován jiným mechanismem nebo má celkově jiný mechanismus účinku. Podezření na jiný mechanismus účinku pak bylo záhy potvrzeno studií [96], která zjistila inhibiční vliv 5-Cl-PZA na mykobakteriální enzym **Fatty Acid Synthase I (FAS I)**, tedy jeden z enzymů podílejících se na syntéze vyšších mastných kyselin s dlouhým řetězcem, esenciální složky buněčné stěny mykobaktérií. Nutno poznamenat, že *in vivo* aktivita 5-Cl-PZA nebyla dosud publikována.

Inhibice FAS I byla jako mechanismus účinku navržena i u jiných derivátů PZA (s 5-Cl substitucí i bez ní) a u některých těchto látek byla i potvrzena. Více je o tomto problému pojednáno v kapitole 3.3.2.

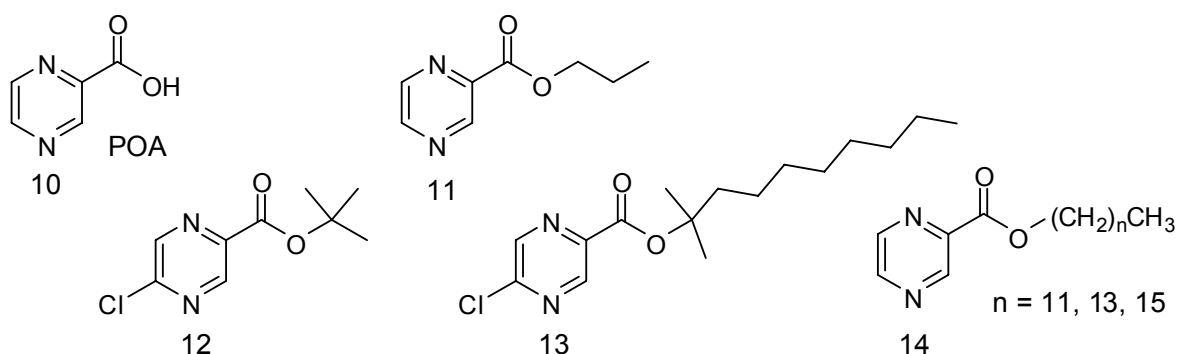
3.4.3 Jednoduché obměny karboxamidové funkce



Již v prvotní práci Kushnera a kol. [116] byla prozkoumána *in vivo* aktivita (po p. o. podání myším) sloučenin vzniklých jednoduchou obměnou karboxamidové skupiny PZA. Byla tak prověřena aktivita thioamidu (**4**), *N*-acetylovaného derivátu (**5**), *N*-methylovaného derivátu (**6**), hydrazidu (**7**) a karbonitrilu (**8**). Žádná z těchto jednoduchých obměn karboxylové skupiny PZA nevedla k účinné látce. Wächter a kol. [117] zkoumali *in vitro* aktivitu isosterů POA. Tatrazolylový isoster POA 2-(1*H*-tetrazol-5-yl)pyrazin (**9**) byl shledán neúčinným.

3.4.4 Estery pyrazinkarboxylové kyseliny jako proléčiva

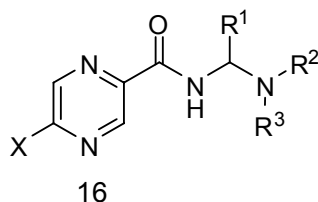
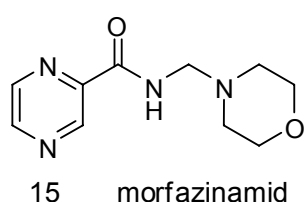
Příprava esterů karboxylových kyselin jako lipofilnějších proléčiv vlastní účinné látky je ve farmaceutické chemii hojně užívaným postupem. Obecně přípravou lipofilnějších proléčiv obvykle sledujeme zlepšení farmakokinetických vlastností léčiva – tedy dostupnosti léčiva v předpokládaném místě působení, v případě mykobaktérií s velmi lipofilní buněčnou stěnou i zlepšený průnik do útrob mikroba – případně ovlivnění organoleptických charakteristik léčiva (maskování nepříjemné chuti apod.). V případě použití strukturně specifických alkoholů (např. hormonální povahy, obecně pak jakéhokoliv ligandu interagujícího s určitou strukturou v organismu) lze dosáhnout částečné cílené distribuce léčiva, tzv. targettingu. Výhodami cílené distribuce jsou poté celkově nižší dávka potřebná k navození terapeutické hladiny v místě působení a menší nežádoucí (toxické) účinky na jiné tkáně.



Samotná kyselina pyrazinkarboxylová (POA, **10**) *in vitro* je antituberkuloticky velice účinná a s vysokou pravděpodobností se jedná o účinnou látku proléčiva PZA (viz 3.3.1). Nicméně v podmínkách *in vivo* se pravděpodobně kvůli nevýhodné farmakokinetice ukázala jako neúčinná [121, 122]. Logickým krokem proto byla snaha o přípravu lipofilních esterů POA s lepším farmakokinetickým profilem. O tento koncept se opět zasloužil kolektiv kolem Michaela H. Cynamona z Upstate Medical Institution, Syracuse, NY, USA. V rámci několika

studii [120, 121, 122] z 90. let 20. století bylo připraveno téměř sedmdesát různých esterů odvozených od POA, 5-Cl-POA, 5-F-POA a 5-CH₃-POA. Přípravou těchto esterů se podařilo účinnost PZA v *in vitro* testech rozšířit i na *Mycobacterium avium* a *M. kansasii*. Jednou z nejúspěšnějších látek byl ***n*-propylester pyrazinkarboxylové kyseliny (11)**, s *in vitro* aktivitou proti *M. tuberculosis* MIC = 0,06 µg/ml [121], tj. asi stokrát vyšší účinností než PZA. U tohoto esteru byl navíc později publikován i jiný mechanismus účinku – inhibice mykobakteriální FAS I, viz kapitola 3.3.2. Problémem esterů jako prekurzorů POA je ovšem jejich nízká stabilita v plazmě. Lidská plazma obsahuje značné množství různých esterů, především butyrylcholinesterasu, paroxonasu a albumin esterasu [123]. Přehledový článek [124] zabývající se SAR esterů POA připravených Cynamonem a kol. konstatuje, že stericky chráněné estery odvozené od terciárních alkoholů, např. *tert*-butyl 5-chlorpyrazinoát (**12**) a 2'--(2'-methyldecyl) 5-chlorpyrazinoát (**13**) mají podobnou *in vitro* aktivitu jako *n*-propylester a zároveň dostatečnou stabilitu v plazmě. Pozdější studie [125] pak zkoumala aktivitu a stabilitu esterů POA s dlouhým nerozvětveným alkylovým řetězcem – dodecylpyrazinoátu, tetradecylpyrazinoátu a hexadecylpyrazinoátu (**14**). Rovněž zde byla nalezena řádově lepší aktivita oproti PZA a zároveň dostatečná stabilita v lidské plazmě. Tato studie pak potvrdila i dostatečnou rychlost hydrolýzy těchto esterů enzymy mykobakteriálního homogenátu.

3.4.5 *N*-substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny



R¹: H, haloalkyl nebo nižší alkyl
R² a R³: nezávisle na sobě alkyl, subst. alkyl, cykloalkyl, aryl, subst. aryl, alkylaryl a subst. alkylaryl; nebo R² a R³ spolu tvoří 6-tičlenný heterocyklický (substituovaný) kruh
R³: H, X, nižší alkyl

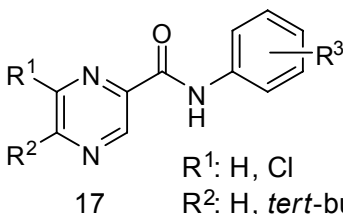
Nejslibnějším derivátem tohoto typu byl po dlouhou dobu **morfazinamid**, *N*-(morfolin-4-ylmethyl)pyrazin-2-karboxamid (**15**). Přestože v některých aplikacích - a to převážně v *in vitro* účinku na intracelulární *M. tuberculosis* v makrofázích - byl morfazinamid výrazně lepší než PZA [131, 132], v *in vivo* experimentech nepřinesl oproti PZA žádné výrazné výhody [133] a od jeho dalšího vývoje bylo postupně upuštěno. V nedávné době byl zájem o tato **aminomethylenová analoga** (mezi které patří i morfazinamid) obnoven. Chung a kol. [134] publikovali sérii 15 aminomethylenových analogů a testovali je na aktivitu *in vitro* na buněčné kultuře a modelu infikovaných makrofágů. Výsledky byly srovnatelné či spíše horší než u PZA (25 – 100 µg/ml proti vůči PZA vnímavým kmenům *M. tuberculosis*).

Ojedinele se však objevila i aktivita proti kmenům rezistentním na PZA. Důvěru v tyto deriváty pak autoři projevili zřízením patentu [135] na tato aminomethylenová analoga (**16**), konkrétně na kombinační terapii kmenů rezistentních vůči PZA kombinací aminomethylenový analog + rifampicin.

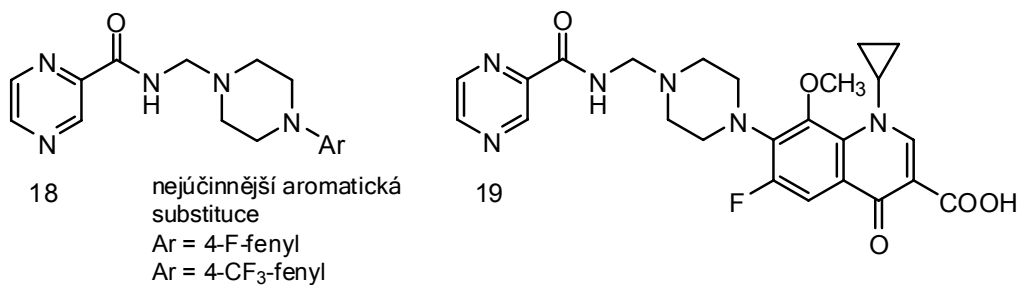
N-substituované amidy POA se měly také uplatnit jako proléčiva, podobně jako tomu bylo u předchozí popisované skupiny esterů. Výše zmiňovaná studie [125] se kromě esterů zabývala i analogickými amidy, tedy *N*-dodecyl, *N*-tetradecyl a *N*-hexadecylpyrazin-2-karboxamidem (**15**). Připravené amidy ovšem nebyly v dostatečné míře hydrolyzovány mykobakteriálním homogenátem a byly tudíž téměř neaktivní.

Fenylem *N*-substituované deriváty PZA, tedy **anilidy kys. pyrazinkarboxylové**, jsou dlouholetým zájmem kolektivu kolem prof. Doležala na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, který v této oblasti publikoval řadu prací [126, 127, 128, 129, 130]. Bylo připraveno přes sto různých anilidů substituovaných na fenylovém i pyrazinovém jádře (**17**). Nejúspěšnější látky vykázaly v testování TAACF při koncentraci 6,25 µg/ml inhibici růstu *M. tuberculosis* přes 90 % - viz Tabulka 5.

Tabulka 5: Přehled nejúčinnějších anilidů POA. Doležal a kol.

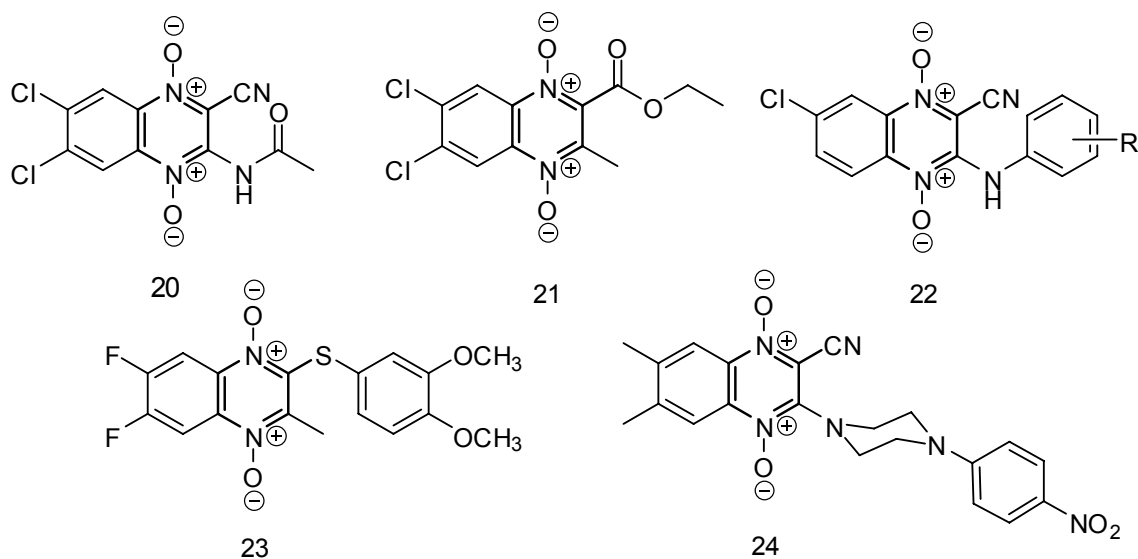
 17 R ¹ : H, Cl R ² : H, <i>tert</i> -butyl	R ¹	R ²	R ³	Inhib. [%] při 6,25 µg/ml	Citace
	H	H	3-CF ₃	99	[130]
Cl	(CH ₃) ₃ C	4-OH	97	[127]	
Cl	(CH ₃) ₃ C	2-OH	96	[127]	
Cl	(CH ₃) ₃ C	3-CF ₃	95	[130]	
Cl	(CH ₃) ₃ C	3-F	88	[129]	

Za poněkud vzdálenější *N*-substituované amidy POA můžeme považovat struktury vzniklé Mannichovou reakcí z pyrazinamidu, formaldehydu a piperazinu substituovaného aromatickým cyklem. Sriram a kol. [136] publikovali celkem 17 látek této obecné struktury (**18**), kde aromátem byl nejčastěji substituovaný fenyl, ale také 2-pyridyl, 2-pyrimidyl nebo benzyl. Z připravených derivátů byly jednoznačně nejúčinnější fenylové deriváty s vysokou lipofilitou, které zároveň obsahovaly deaktivující substituenty 4-CF₃ nebo 4-F. Aktivita těchto látek byla velmi dobrá, 0,78 resp. 1,76 µg/ml proti *M. tuberculosis* a podobnou aktivitu vykázaly i proti MDR kmenům. V rámci studie autoři připravili i několik látek, v nichž využili strukturního motivu fluorochinolonů. Nejúčinnější látka (**19**) vykázala MIC = 0,39 µg/ml proti PZA citlivému kmenu a MIC = 0,2 µg/ml proti MDR kmenu *M. tuberculosis*.

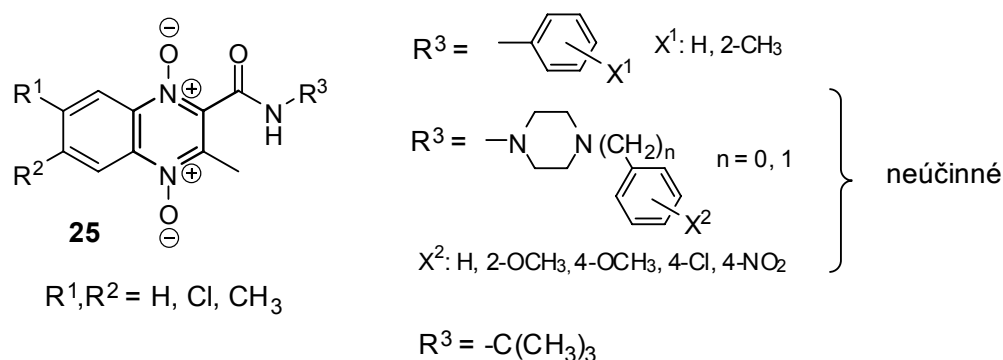


3.4.6 Pyrazinamid jako součást chinoxalinového skeletu

Deriváty chinoxalin-1,4-*N*-dioxidového skeletu vykazují širokou paletu biologických účinků, mimo jiné účinky antibakteriální, antimykobakteriální, antikandidózní, antiprotozoární a mutagenní [137]. Jen za posledních deset let bylo publikováno 51 původních prací zabývajících se antimykobakteriálními účinky struktur obsahujících chinoxalinové a častěji chinoxalin-1,4-dioxidové jádro. Vývoj těchto látek s antimykobakteriální aktivitou do roku 2005 zachycuje přehledový článek [137]. Antimykobakteriální aktivita byla zaznamenána u různě substituovaných derivátů, z nichž většina nesla na pyrazinové části molekuly karbonitrilovou (**20,22,24**) nebo karboxylovou funkci (**21**) a můžeme je tak považovat za jistou obdobu pyrazinkarboxylové kyseliny. V polohách 6 a 7 chinoxalinového kruhu se osvědčila substituce halogenem (**20,21,22,23**) či methylem (**24**). V poloze 3 se pak často uplatnila substituovaná aminoskupina (**22,24**) případně její acetamidová podoba (**20**). Odkazy na původní literaturu pro jednotlivé struktury je možno najít ve zmiňovaném přehledovém článku [137].



Následující studie pak prověřily aktivitu přímo chinoxalin-1,4-dioxidového jádra s *N*-substituovanou karboxamidovou funkcí v poloze 2 – tedy velmi blízká analoga PZA. Práce kolektivu Zaranz, Monge [138] prezentovala antimykobakteriální aktivitu hodnocenou dle metodiky TAACF (viz kapitola 4.1.1) 31 různých derivátů obecné struktury **25**, kde amidová skupina byla substituována (R^3) různě substituovanými fenyley, *tert*-butylem, nebo 4-fenylpiperazin-1-ylem, případně 4-benzylpiperazin-1-ylem. Jako neúčinnější v této sérii se ukázala substituce fenylem, naopak vložení piperazinového můstku mezi karboxamidovou funkci a fenylové jádro vedlo ve všech případech k neúčinným látkám. Absolutně neúčinnější byl 6,7-dichlor-3-methyl-*N*-fenylchinoxalin-2-karboxamid 1,4-dioxid s MIC proti *M. tuberculosis* 0,78 $\mu\text{g/ml}$. Další tři anilidy pak měly MIC $\leq 3,25 \mu\text{g/ml}$.

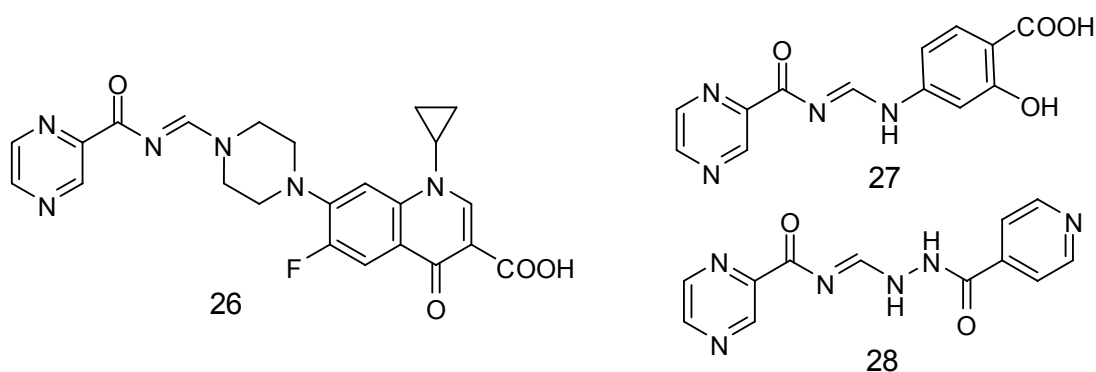


V rámci práce jiného autorského kolektivu [139] byly syntetizovány *N*-substituované chinoxalin-2-karboxamid 1,4-*N*-dioxidy většinou s fenylem v poloze 3 chinoxalinového jádra. Autoři v této studii zkoumali vliv propojovacího alkylenového můstku $-(\text{CH}_2)_n-$ pro $n = 0$ až 3 mezi karboxamidovou skupinou a fenylovým jádrem. Nejlepším se ukázal být methylenový můstek ($n = 1$). Většina látek vykázala dle TAACF metodiky alespoň střední aktivitu, nejlepší látky pak vykázaly MIC proti *M. tuberculosis* v rozmezí 3 – 6 $\mu\text{g/ml}$. Studie rovněž potvrdila vhodnost substituce chinoxalinového jádra v poloze 6 a/nebo 7 desaktivujícími skupinami, především chlorem. Tento závěr je v souladu s pozorováním v rámci předchozí zmiňované série struktury **25**.

Závěrem je možno konstatovat, že ze skupiny chinoxalin-1,4-*N*-dioxidů bylo publikováno mnoho látek se zajímavou antituberkulotickou aktivitou, v některých případech včetně aktivity proti kmenům rezistentním vůči PZA. Otázkou zůstává mechanismus účinku těchto látek ve smyslu zjištění, zda se jedná o účinek založený na strukturní podobnosti s PZA/POA, nebo je mechanismus účinku odlišný. Dobrá aktivita chinoxalin-1,4-*N*-dioxidů by nás rovněž mohla inspirovat ke strukturní obměně – vytvoření *N*-oxidů - v sériích anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny popisovaných výše v kapitole 3.4.5.

3.4.7 Jiné deriváty pyrazinamidu

Imramovský a kol. [140] publikovali koncept nových antituberkulotik vzniklých spojením dvou samostatně antimykobakteriálně účinných fragmentů. Jako výchozí jednotky byly použity PZA, INH, kys. *para*-aminosalicylová (PAS), EMB a ciprofloxacin. Kombinace PZA s ciprofloxacinem (**26**), PAS (**27**) a INH (**28**) jsou zobrazeny níže. Tyto látky vykázaly dobrou *in vitro* aktivitu proti *M. tbc* H37Rv v řádu jednotek nebo desetin $\mu\text{g/ml}$. Byla zaznamenána i aktivita vůči MOTTs. Zvýšená aktivita je dle autorů spojená s nárůstem lipofility (spojení dvou fragmentů do jednoho celku). Látky jsou převděpodobně účinné až po uvolnění původních fragmentů.



Palek a kol. [143] připravili sérii antimykobakteriálně aktivních 3-(fenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů s různou substitucí na fenylovém jádře. Tato série bude diskutována na jiném místě této práce (kapitola 5.3.4).

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Používané syntetické postupy

V rámci této disertační práce byly pro přípravu meziproduktů a finálních sloučenin používány výhradně metody dříve popsané v literatuře [141, 142, 143]. Na tomto místě tak není třeba tyto metody popisovat. Ze syntetického hlediska tato práce vychází z předešlých kvalifikačních prací obhájených na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv (Dlabal [144], Doležal [145], Jampílek [146], Palek [147]). Konkrétní podmínky reakcí a výtěžky lze nalézt v příslušných pracech, které tvoří přílohy P1-P5.

4.1 Metodika biologického hodnocení

Přestože většina zde uvedených metod je popsána v jednotlivých komentovaných publikacích autora, považuji za vhodné zde uvést některé podrobnosti a souvislosti, které by v jednotlivosti daných článků nemusely být zřejmé. Především stať o testování v rámci programu TAACF (viz dále) objasní poměrně složitou metodiku testování, která se navíc v průběhu času měnila a je tak příčinou různě vyjádřených výsledků.

4.1.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity v rámci programu TAACF

Projekt TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility) [148] byl založen v USA v roce 1994 při americkém Národním institutu pro alergie a infekční nemoci (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID). Až do března roku 2010 byl tento projekt zaměřen výhradně na podporu akademického výzkumu nových antituberkulotik. Laboratoře z celého světa mohly na základě bezplatných kontraktů zasílat vzorky nově připravených sloučenin k testování. Zároveň bylo zajištěno, že vlastnická práva k dané sloučenině (publikování, případné patenty) zůstávají s původcem dané sloučeniny. Projekt TAACF v této podobě skončil v březnu 2010 a v současné době se zaměřuje na testování vybraných strukturních typů *in vivo*.

Velkým přínosem TAACF bylo zprostředkovávání spolupráce mezi různými laboratořemi včetně napojení do farmaceutického průmyslu. Výsledky testů sloučenin, které nejsou chráněny vlastnickými právy, jsou publikovány na webu TAACF [149].

Portfolio dostupných testů v rámci TAACF tvořily *in vitro* testy na určení aktivity, *in vitro* testy s infikovanými makrofágy, *in vivo* testy na různých myších modelech, testy biodostupnosti sloučeniny na myším modelech, testy cytotoxicity na VERO buňkách a další. Od roku 2001 bylo rovněž zavedeno HTS (High-Throughput Screening) testování na vybrané subcelulární cíle (enzymy).

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové měla v rámci kontraktu možnost testování v rámci TAACF, který se tak stal zdrojem některých výsledků publikovaných v rámci této disertační práce. V rámci správné interpretace je proto zapotřebí nastínit metodiku základních screeningových *in vitro* testů.

- **Level 1: Primary Assay Data.** Všechny sloučeniny jsou testovány proti *M. tuberculosis* H37Rv při ředění 6,25 µg/ml. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentuální inhibice růstu detekovaná jako pokles fluorescence. Sloučeniny vykazující při této koncentraci míru inhibice > 90 % jsou označeny jako „aktivní“ a postupují do druhého kola hodnocení – Level 2.
- **Level 2: MIC Assay Data.** Slouží k přesnému stanovení MIC.
- **Level 2: Cytotoxicity Assay Data.** Stanovení cytotoxicity na VERO buňkách. Cytotoxicita je vyjádřena jako IC₅₀ – koncentrace testované látky hubící 50 % buněk. Praktickým vyjádřením toxicity je tzn. index selektivity SI = IC₅₀ / MIC₉₀. Sloučeniny s SI > 10 postupují do třetího kola hodnocení – Level 3.
- **Level 3: Macrophage Assay Data.** *In vitro* test na modelu makrofágů infikovaných TBC. Sleduje se pokles růstu reziduálních mykobaktérií v makrofágu, výsledky vyjádřeny jako EC₉₀ a EC₉₉, tedy koncentrace látky snižující tento růst o 90 resp. 99 %. Látky s EC₉₀ > 16 x MIC jsou označeny jako „neaktivní.“
- **Level 3: SDRMIC Data Assay.** Zjišťování MIC vůči vybraným kmenům *M. tuberculosis* s rezistencí.
- **Level 3:** další testy např. na aktivitu vůči *M. avium*

Shora uvedené schéma testování bylo v průběhu projektu TAACF mírně pozměněno:

- **Primary Screen (Dose Response): Determination of a 90% Inhibitory Concentration (IC₉₀).** Primární test, metoda MABA (viz kapitola 4.1.5). Naředěné látky (obvykle v rozmezí 100 – 0,19 µg/ml) jsou testovány vůči *M. tuberculosis*. Výsledkem jsou přímo hodnoty IC₅₀ a IC₉₀. Sloučeniny s IC₉₀ ≤ 10 µg/ml jsou označeny jako „aktivní“ a postupují do dalšího testu.

- **Secondary Screen: Determination of Mammalian Cell Cytotoxicity (CC₅₀).** Test na určení cytotoxicity pro savčí buňky, VERO model. Ekvivalent výše uvedeného Level 2: Cytotoxicity Assay Data.

Výše uvedená drobná změna metodiky standardního testování v rámci TAACF vysvětluje, proč u některých látek této práce (a publikací našeho autorského kolektivu) je uveden pouze údaj o procentuální inhibici a chybí konkrétně určené hodnoty IC₅₀ a IC₉₀. Je tomu tak u látek testovaných dle starší metodiky, které zároveň neprošly do druhého kola testování.

4.1.2 Hodnocení antimykobakteriální aktivity ve spolupráci s Pardubickou krajskou nemocnicí a Fakultní nemocnicí v Hradci Králové

Testování na antimykobakteriální aktivitu prováděné ve spolupráci s Krajskou nemocnicí v Pardubicích (Oddělení klinické mikrobiologie) a později s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové (Ústav klinické mikrobiologie) byly významným zdrojem informací o antimykobakteriální aktivitě látek připravených v rámci této disertační práce. V porovnání s testováním v rámci TAACF byly výsledky poskytovány v kratším čase a na rozdíl od TAACF byla testována i účinnost na jiné druhy mykobaktérií – *M. kansasii* a *M. avium*.

Test byl prováděn mikrodiluční metodou na mikrotitračních destičkách s vizuálním odečtem. Testované kmeny mykobaktérií byly zakoupeny z České národní sbírky typových kultur (CNCTC, [150]) při Státním zdravotním ústavu. Jednalo se o následující kmeny: *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. avium* CNCTC My 80/72 a *M. avium* CNCTC My 152/73.

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovou řadou. Testované koncentrace byly nejprve 128 – 64 – 32 – 16 – 8 – 4 – 2 µg/ml, později bylo ředění změněno na 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,13 µg/ml a nakonec o jeden řád posunuto k nižším koncentracím 100 až 1,56 µg/ml. Vlastní ředění látek probíhalo dvojnásobným způsobem. Dle prvního způsobu byla připravena zásobní koncentrace testované látky v DMSO a další ředění bylo prováděno dvojkovým ředěním do zkumavek s připravenou půdou. Dle novějšího způsobu ředění se rozpuštěná látka v DMSO dvojkově ředila do zkumavek s DMSO a kultivační půda byla přidávána teprve do jamek mikrotitrační destičky. Tento druhý způsob se ukázal být vhodnější pro látky s vyšší lipofilitou hůře rozpustné v testovacím médiu. Dle staršího postupu u lipofilnějších látek totiž docházelo k částečnému vysrážení látky po přidání základního ředění v DMSO do kultivačního média. Tento precipitovaný podíl se často již

nepodařilo rozpustit ani dalším ředěním do média, v důsledku čehož mohlo docházet ke zkresleným výsledkům vinou nepřesného ředění. U novějšího způsobu ředění do DMSO byl tento problém výrazně omezen, ne-li odstraněn.

Základní vodná suspenze mykobaktérií byla pomocí denzitometru upravena na koncentraci 0,5 – 1 dle McFarlandovy stupnice. Z této základní suspenze byly připraveny výsledné suspenze s ředěním 10^{-1} a 10^{-3} , kterými se inokulovaly mikrotitrační destičky. Mykobaktéria byla kultivována v Šulově půdě (Trios, Praha) o pH = 5,5 – 5,7 v inkubátoru při 36 ± 1 °C a zajištění vhodné vlhkosti prostředí o dobu 14 - 21 dnů. Kritériem doby kultivace je dostatečný nárůst v kontrolní jamce – médium s 0,5% DMSO. I přes používání komerčně připravovaných půd muselo být jejich pH pravidelně kontrolováno – posun pH k vyšším hodnotám se projevil jako snížení účinnosti PZA vůči *M. tuberculosis*.

Hodnoty MIC [$\mu\text{g/ml}$] byly odečteny vizuálně jako nejnižší testovaná koncentrace, při které došlo k viditelnému potlačení růstu mykobaktérií. Aby byl odečet platný, nesmí se hodnoty MIC pro ředění mykobakteriální suspenze 10^{-1} a 10^{-3} lišit o více než jeden řád. Dále musí být viditelný nárůst mykobaktéria v kontrolní jamce s DMSO bez testované látky – vyloučení vlivu DMSO na růst kmene a ověření viability kmene pro vyloučení falešně pozitivních výsledků. V kontrolních jamkách se standardem (PZA nebo isoniazid) musí být viditelná inhibice růstu – odlišení možné bakteriální kontaminace vedoucí k falešně negativním výsledkům. Jako standard byl používán PZA, která byl později u necitlivých kmenů *M. avium* a *M. kansasii* nahrazen isoniazidem.

Obrázek 7 zachycuje schematické znázornění mikrotitrační destičky, způsob ředění látek a rozmístění kontrol dle posledního protokolu pro testování antimykobakteriální aktivity používaného ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Obrázek 7: Schematické znázornění mikrotitrační destičky, způsobu ředění a kontrol dle posledního protokolu pro testování antimykobakteriální aktivity. (K = kontrola růstu, koncentrace v $\mu\text{g/ml}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ředění	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-3}
A	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
D	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
E	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
F	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
G	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
H	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
	PZA nebo INH		Látka 1		Látka 2		Látka 3		Látka 4		Látka 5	

Vzhledem k rozdílným molekulovým hmotnostem testovaných látek by bylo přesnější a správnější provádět ředění v molárních koncentracích. V odborné literatuře se však velmi často antimykobakteriální aktivita udává v hmotnostních koncentracích [$\mu\text{g/ml}$]. Hmotnostní koncentrace také používají testovací protokoly TAACF. Molekulová hmotnost některých látek připravených v této práci byla téměř trojnásobná v porovnání s molekulovou hmotností standardu PZA. Proto tam, kde to bylo vhodné, byly výsledné MIC [$\mu\text{g/ml}$] přepočteny a uváděny i jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]. Molární vyjádření bylo používáno i při analýzách SAR.

4.1.3 Hodnocení antifungální aktivity

Hodnocení antifungální aktivity vůči vybraným oportunním patogenům člověka bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Látky byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou [151]. Testovanými kmeny byly *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), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

Látky byly rozpuštěny v DMSO a dvojkově ředěny v médiu RPMI 1640 s glutaminem. Výsledná koncentrace DMSO byla menší než 2,5 % (v/v) a pomocí kontroly bylo ověřeno, že DMSO v této koncentraci neovlivňuje růst testovaných hub. Inkubace byla prováděna v médiu RPMI 1640 s glutaminem pufrovaným na pH = 7,0 pomocí MOPS (3-morfolinpropan-1-sulfonové kyseliny). Podmínky: statická inkubace za tmy, 35 °C. Hodnoty MIC byly odečteny vizuálně po 24 a 48 hod., v případě pomalu rostoucího *Trichophyton mentagrophytes* po 72 a 140 hod. Jako standardy byly použity flukonazol, nystatin či amfotericin B.

4.1.4 Hodnocení antibakteriální aktivity

Hodnocení antibakteriální aktivity vůči vybraným patogenům bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Látky byly testovány mikrodiluční bujónovou metodou [152]. Testované kmeny pocházely z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, CCM, [153]) při Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Jednalo se o kmeny: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. Další kmeny byly klinickými izoláty získanými na Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Jednalo se o meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* H

5996/08 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus* sp. J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D11750/08, multirezistentní *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 s širokospektrou betalaktamasou (EBSL positive).

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a dvojkově naředěny tekutou půdou. Konečná koncentrace DMSO byla ≤ 1 % a pomocí kontroly bylo prokázáno, že tato koncentrace neovlivňovala růst bakterií. Bakteriální suspenze byla připravena přenesením inokula do isotonického roztoku a hustota této suspenze byla upravena na 0,5 dle McFarlandovy stupnice (odpovídá $1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). Kultivace byla prováděna v tekutém Müller-Hinton agaru (MHA) při pH = 7 a teplotě 35 °C. Hodnoty MIC (definovány jako 95% inhibice růstu vůči kontrole) byly odečteny po 24 a 48 hod kultivace a jsou udávány v $\mu\text{mol/l}$.

4.1.5 Jiné *in vitro* metody testování antimykobakteriální aktivity

Metody popisované v této podkapitole nebyly většinou přímo využity v rámci této práce. Částečnou výjimkou je metoda MABA (viz níže), jejíž princip byl využíván při stanovování MIC v rámci testování v programu TAACF (kapitola 4.1.1). Ostatní metody jsou uvedeny pro vytvoření přehledu o fyzikálních principech, které jsou využívány pro detekci růstu mykobaktérií.

Pomalý růst *M. tuberculosis* i jiných mykobaktérií je velmi limitujícím faktorem při *in vitro* testování na antimykobakteriální aktivitu. Není výjimkou, že na dostatečný nárůst kolonie pro odečet MIC je třeba čekat i tři týdny. Obvyklá doba nárůstu pak činí 10-14 dní a je velmi proměnlivá. To vyžaduje plnou pozornost testy provádějícího laboranta a je překážkou možné automatizace testování, která by zvýšila jeho kapacitu a vedla k urychlení celého procesu vývoje nových antituberkulotik. Rychlejší testování je třeba i pro dostatečně rychlé stanovení citlivosti izolátu od konkrétního pacienta. Důkazem naléhavosti tohoto problému je fakt, že už na počátku 70. let minulého století došlo k rozvoji metod, umožňujících urychlení testovacího procesu. Tyto metody jsou založeny na odlišné, zpravidla fyzikálně-chemické, detekci růstu mykobaktérií.

Radiometrická detekce růstu mykobaktérií – systém BACTEC

Metoda je založena na utilizaci ^{14}C značeného substrátu sledovaným organismem za vzniku $^{14}\text{C} - \text{CO}_2$. V obecné mikrobiologii se tyto techniky objevily již na konci 60. let minulého století [154]. Praktická možnost využít tuto metodu i pro *M. tuberculosis* pak byla demonstrována autory Cummings a kol. [155], kteří využili ^{14}C značený glycerol a acetát.

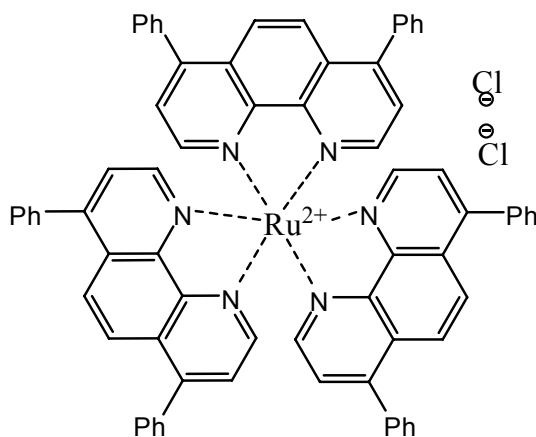
Standardním a dodnes využívaným radioaktivním substrátem pro detekci růstu mykobaktérií se ovšem stala Middlebrookem [156] zavedená 1- ^{14}C značená kys. palmitová (tedy značená na uhlíku C_1). Kultivace mykobakterií je prováděná v uzavřené lahvi. Vznikající radioaktivní CO_2 je poté odváděn a jeho množství detekováno. V práci Siddiqi a kol. [157] byla poté prokázána dobrá shoda mezi výsledky této radiometrické metody a standardním *in vitro* testováním. K rozlišení antimykobakteriálně aktivní látky od neaktivní v této studii stačilo sledování CO_2 po dobu tří až čtyř dnů. Metoda je proto velice vhodná pro aplikaci v rámci HTS (High-Throughput Screening, screening s vysokou kapacitou).

Instrumentální provedení této metody je často přístroj BACTEC 460 původně vyvinutý firmou Johnston Laboratories (Towson, MD, USA) a do komerční sféry uvedený firmou Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA).

Systém MGIT

Tento systém [158] je nejnovějším produktem firmy Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA). MGIT znamená Mycobacteria Growth Indicator Tube. Mykobaktéria jsou kultivována ve speciálních zkumavkách, na jejichž dně je v silikonu inkorporovaný fluorescenční indikátor tris(4,7-difenyl-1,10-fenantrolin)ruthenium(II) dichlorid – CAS: 36309-88-3 – viz Obrázek 8. Tento indikátor zakotvený v matrici vytváří chemiluminiscenční senzor, jehož luminiscence je závislá na koncentraci kyslíku O_2 [159]. Na základě změny koncentrace O_2 v čase je odvozena intenzita růstu mykobaktérií. Výhodou systému MGIT není ani tak absolutně vyšší rychlost testování jako spíše absolutní automatizace a velký počet paralelně zpracovávaných vzorků (až 960).

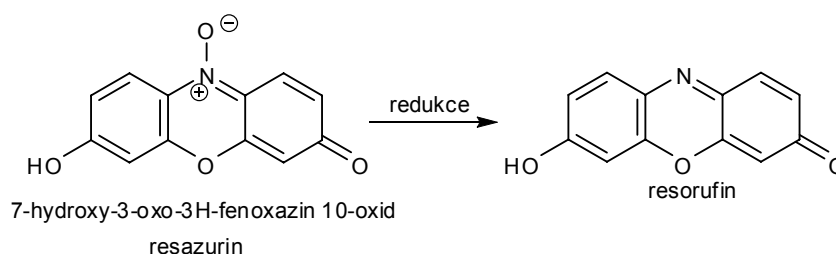
Obrázek 8: tris(4,7-difenyl-1,10-fenantrolin)ruthenium(II) dichlorid



MABA – Microplate Alamar Blue Assay

Barvivo Alamar blue™ neboli resazurin je redoxní barvivo rozpustné ve vodě široce používané k detekci živých buněk a jejich růstu. Uplatnění nalézá např. i při testech cytotoxicity na savčích buňkách [160]. Resazurin má v oxidované formě modrou barvu a nevykazuje fluorescenci. Po vstupu do živé buňky je redukován vícero redoxními systémy buňky. Redukovaná forma je růžová a vykazuje silnou fluorescenci [160, 161]. Tato změna v zabarvení a fluorescenci je tak přímým měřítkem přítomnosti živých buněk a jejich viability. Výsledek lze odečítat spektrofotometricky nebo přesněji detektorem fluorescence. Výhodami metody je snadné instrumentální provedení, finanční nenáročnost, stabilita barviva a jeho netoxičnost vůči experimentátorovi i zkoumaným buňkám. Oproti metodě BACTEC je nespornou výhodou absence radioaktivity a tudíž jednodušší zacházení s odpadovým materiálem. Vhodnost této metody byla potvrzena i pro testování antimykobakteriální aktivity. Výsledky mohly být odečítány už po sedmi až osmi dnech inkubace [162]. Rovněž byla ověřena dobrá shoda mezi výsledky testování pomocí metod MABA a BACTEC [162, 163]. Vzhledem ke své rychlosti a nenáročnosti je metoda MABA velice vhodná pro použití v rámci HTS testování [163].

Obrázek 9: Resazurin (Alamar Blue™) a jeho redukce



5 KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE

Většina dosažených výsledků byla úspěšně publikována v zahraničních odborných recenzovaných časopisech. Tyto výsledky nebudou v této kapitole pro přehlednost uvedeny v plném znění. Publikované série budou spojeny do logických celků dle struktury a bude proveden komentář těchto výsledků s vyzdvihnutím souvislostí ve vztahu k ostatním výsledkům této disertační práce. Analytická data připravených sloučenin, podrobnosti týkající se jejich syntézy a další podrobnosti je možno dohledat v článcích, které tvoří přílohy P1 – P4 a P6 této práce. Příloha P5 pak obsahuje v době odevzdání nepublikované výsledky. Na příslušnou přílohu bude čtenář vždy jasně odkázán.

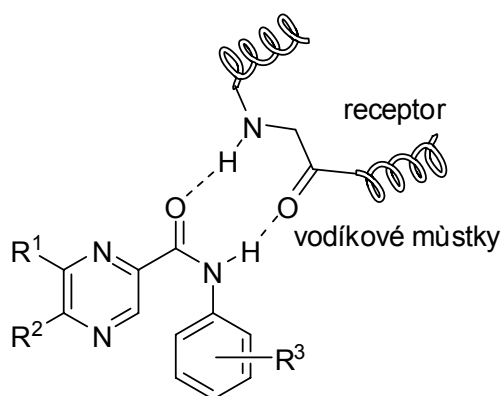
Dosažené výsledky byly prezentovány i na odborných konferencích formou plakátových sdělení a přednášek. Úplný přehled výstupů je uveden v kapitole 9.

5.1 Příprava a biologická aktivita *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů

- komentář publikovaných článků tvořících přílohy P1 a P2

Přípravou *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů, neboli anilidů kyseliny pyrazinkarboxylové, se autorský kolektiv kolem prof. Doležala zabývá již několik let. Sloučeniny tohoto typu můžeme považovat za lipofilnější analoga pyrazinamidu (PZA). Základ molekuly je tvořen dvěma aromatickými jádry, pyrazinovým a fenylovým, spojenými spojovacím můstkem – CONH–. Tato typicky „peptidová“ vazba by se mohla podílet na vazbě této molekuly na receptory proteinové povahy, neboť je zde možnost vytvoření dimerního páru prostřednictvím vodíkových vazeb tak, jak ukazuje Obrázek 11. Základní struktura *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů umožňuje obměnu zavedením různých substituentů na pyrazinové jádro i do fenylové části molekuly. Autor této disertační práce se podílel na syntéze těchto látek.

Obrázek 10: Možná vazba substituované karboxamidové skupiny látky na proteinový řetězec receptoru pomocí vodíkových můstků



5.1.1 Přehled připravených látek

Bylo připraveno celkem 28 látek, z toho 20 v literatuře předtím nepopsaných. Látky byly rozděleny do dvou sérií a publikovány samostatně v odborné literatuře.

Tabulka 6: Přehled připravených *N*-fenyropyrazin-2-karboxamidů

pyrazinová část společná pro obě série	série 1 [P1] fenylová část	série 2 [P2] fenylová část	
R ¹ R ²	R ³	R ³	
1. H H	1. 4-CF ₃	1. 3-Cl	
2. Cl H	2. 2-Br-3-CH ₃	2. 4-Cl	
3. H -CH(CH ₃) ₃	3. 3-I-4-CH ₃	3. 2,6-Cl ₂	
4. Cl -CH(CH ₃) ₃		4. 3,4-Cl ₂	
	4 x 3 = 12 látek	4 x 4 = 16 látek	celkem 28 látek

5.1.2 Syntéza

Syntéza finálních struktur probíhala pomocí zavedených metod přes chlorid příslušné kyseliny. Výchozí kyselina byla rozptýlena či rozpuštěna v bezvodém toluenu a refluxována s přidavkem thionylchloridu (SOCl₂) po dobu 1 hod. Rozpuštědla byla vakuově odpařena a zbytky SOCl₂ byly odstraněny opakovanou azeotropní destilací s toluenem. Surový chlorid kyseliny byl bez prodlení rozpuštěn v bezvodém acetonu a za míchání přikapán do roztoku příslušného anilinu s pyridinem za laboratorní teploty. Po ukončení reakce byla reakční směs vylita do ledové vody, surový produkt byl odfiltrován a přečištěn metodou flash chromatografie (silikagel, hexan - ethyl-acetát). Celkové výtěžky se pohybovaly v rozmezí 43 – 97 % s průměrem okolo 80 %.

5.1.3 Antimykobakteriální aktivita

Série 1

Antimykobakteriální aktivita látek ze série 1 byla hodnocena v Pardubické krajské nemocnici i v rámci programu TAACF (viz kapitola 4.1.1). Dle aktivit zjištěných v Pardubické krajské nemocnici lze konstatovat, že s výjimkou 6-chlor-*N*-(2-brom-3-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamidu byly všechny látky ze série 1 dobře účinné proti *M. tuberculosis* (MIC nejčastěji 2 – 8 µg/ml, přičemž PZA vykázal MIC = 8 µg/ml). Při stejné substituci ve fenylové části molekuly byly nejúčinnější deriváty nesubstituované pyrazinkarboxylové kyseliny ($R^1, R^2 = H$). Zavedením chloru, *tert*-butylu nebo obojího do pyrazinové části molekuly došlo vždy ke zhoršení účinku (zvýšení MIC minimálně o jedno až dvě ředění). Porovnáme-li aktivitu z hlediska substituce fenylové části molekuly, můžeme konstatovat, že nejméně vhodnou se jevila 2-Br-3-CH₃ substituce. 4-CF₃ a 3-I-4-CH₃ substituce pak dávaly podobně dobré výsledky. Aktivita proti netypickým mykobaktériím (MOTTs) byla pozorována pouze u 6-chlor-*N*-(4-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamidu – MIC proti *M. kansasii* byla 32 µg/ml. Ostatní látky ze série 1 nevykázaly aktivitu proti MOTTs.

Výsledky z TAACF byly poněkud nekoherentní s výš uvedeným. Jako nejlepší látka byl dle TAACF označen 5-*tert*-butyl-6-chlor-*N*-(3-jod-4-methyl)pyrazin-2-karboxamid s IC₉₀ pro *M. tuberculosis* 0,819 µg/ml. Další významná aktivita byla zjištěna pouze u 5-*tert*-butyl-6-chlor-*N*-(4-trifluormethyl)pyrazin-2-karboxamidu – IC₉₀ = 20,7 µg/ml. Ostatní látky byly neaktivní. Je otázkou, nakolik jsou tyto údaje správné – podezřelými se zdají být hodnoty zjištěné v TAACF pro dvě látky, u nichž byly hodnoty IC₅₀ vyšší IC₉₀.

Série 2

V sérii 2 máme k dispozici výsledky testování dle starší metodiky TAACF, tedy udávané procento inhibice růstu při jednotné koncentraci 6,25 µg/ml (viz kapitola 4.1.1).

Experimentálně změřená lipofilita látek v této sérii rostla podle substituce na pyrazinovém jádře v řadě pyrazin < 6-chlorpyrazin < 5-*tert*-butylpyrazin < 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazinový derivát. Dle substituce fenyly pak lipofilita rostla v řadě 3-Cl < 4-Cl < 2,6-Cl₂ < 3,4-Cl₂. Lipofilita ovšem nebyla určujícím faktorem antimykobakteriální účinnosti. Důležitějšími parametry byla substituce molekuly v pyrazinové i fenylové části. Z výsledků

jednoznačně vyplynul pozitivní efekt zavedení chloru do polohy 6 pyrazinového jádra ($R^1 = Cl$). Naopak zavedením *tert*-butylu do polohy 5 (R^2) byla aktivita ve většině případů snížena. Z hlediska substituce fenylové části se jako nevhodná ukázala 2,6-Cl₂ substituce, která ve všech čtyřech případech poskytla neúčinné látky. 3-Cl substituce poskytla mírnou aktivitu. Nejlepší aktivity byly dosaženy u 3,4-Cl₂ substituce a především u 4-Cl substituce fenylové části molekuly. Jednoznačně tak vyplynul pozitivní efekt zavedení chloru především do polohy 4 fenylového jádra.

Nejúčinnějšími látkami z této série tak byly 6-chlor-*N*-(4-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid a 6-chlor-*N*-(3,4-dichlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid s inhibicí růstu *M. tuberculosis* 65 % resp. 61 % při koncentraci 6,25 µg/ml.

5.1.4 Závěr

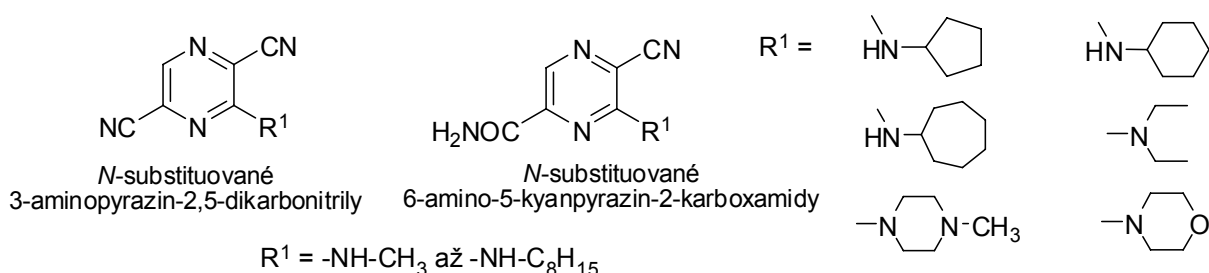
Ve dvou sériích *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů byla zjištěna zajímavá antimykobakteriální aktivita. Byly identifikovány substituční vzory, které měly jednoznačně pozitivní efekt na tuto aktivitu, substituce, které měly obojaký efekt, i substituce, které vedly ke snížení aktivity. Jelikož se autorský kolektiv kolem prof. Doležala látkám tohoto strukturního typu věnuje již delší dobu, je potřeba se na látky uvedené v této disertační práci dívat v kontextu všech dosud připravených *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů (celkem přes sto látek). Přehled těch nejúčinnějších byl publikován časopisecky (publikace P6) a úplný přehled včetně experimentálně určených parametrů lipofility lze nalézt jako součást monografie (publikace P7).

5.2 Příprava a biologická aktivita nearomaticky *N*-substituovaných 6-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrilů

- komentář publikovaných článků tvořících přílohy P3 a P4

Tyto dvě série byly publikovány samostatně ve dvou oddělených článcích [P3, P4]. Jedná se však o série, které se strukturně liší pouze náhradou jedné karboxamidové skupiny za skupinu nitrilovou. Aspekty týkající se syntézy těchto látek byly velmi podobné a i při hodnocení antimykobakteriální aktivity jsme mohli vysledovat společné závislosti struktury a účinku (Structure-Activity Relationships, SAR). Proto jsou v této kapitole obě série spojeny a popisovány jako ucelený soubor.

5.2.1 Přehled připravených látek



Látky této těchto dvou sérií byly připraveny nukleofilní substitucí výchozích chlorderivátů 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitrilu [143] a 6-chlor-5-kyanpyrazin-2-karboxamidu, přičemž druhá jmenovaná látka byla dosud v literatuře nepopsaná. Výchozí látky byly substituovány nearomatickými aminy (alkylaminy, cykloalkylaminy, diethylaminem a heterocyklickými *N*-methylpiperazinem a morfolinem). Celkem bylo připraveno 29 dříve nepublikovaných látek.

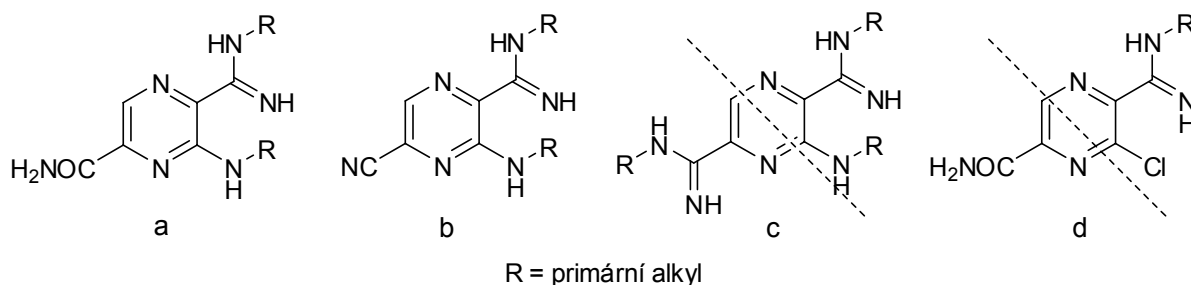
5.2.2 Syntéza

3-Chlorpyrazin-2,5-dikarbonitril byl připraven dle literatury [143]. 6-Chlor-5-kyanpyrazin-2-karboxamid byl připraven homolytickou amidací zakoupeného 3-chlorpyrazin-2-karbonitrilu. Touto reakcí mohly principiálně vzniknout dva různé isomery v závislosti na poloze, do které se váže karbamoylový radikál. Skutečná poloha byla ověřena chemicky, kdy získaný neznámý polohový isomer byl dehydratací pomocí chloridu fosforylu dehydratován

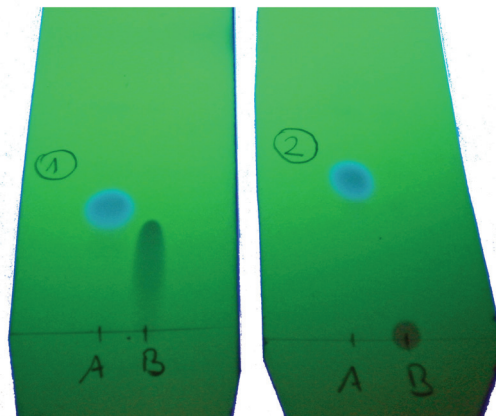
na 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitril, jehož totožnost byla ověřena porovnáním fyzikálně-chemických konstant s literaturou. Podrobnosti viz příloha [P3].

Samotná nukleofilní substituce probíhala velice rychle i při laboratorní teplotě. Při použití nadbytku aminu pro vyvázání vznikajícího chlorovodíku byl v reakční směsi detekován vedlejší produkt vznikající nukleofilní adicí aminu na karbonitrilovou funkci za vzniku amidinového uskupení (Obrázek 11). Tato vedlejší reakce probíhala převážně u primárních aminů, u sekundárních pouze omezeně či vůbec. Několik těchto vedlejších produktů bylo izolováno a struktura dvou z nich byla potvrzena NMR a MS. Obě struktury potvrzené NMR sice patřily do série kyankarboxamidů, nicméně na základě elektronových poměrů se můžeme domnívat, že i v případě dikarbonitrilů (které nabízí dvě $-CN$ skupiny) docházelo k adici na totožnou karbonitrilovou skupinu v sousedství substituované aminoskupiny. Nebyla pozorována současná adice na obě $-CN$ skupiny (Obrázek 11, c). Vzhledem k velké rychlosti probíhající substituce chloru nebyl pozorován ani produkt s amidinovou skupinou a zachovaným chlorem (např. Obrázek 11, d). Vedlejší produkty vykazovaly při TLC (silikagel, hexan - ethyl-acetát 1:1 či 2:1) téměř totožné retenční faktory R_f , což znemožňovalo dobrou separaci pomocí flash chromatografie. Tento problém byl vyřešen modifikací mobilní fáze přidávkem 1 % (v/v) 99 % kyseliny octové. Tato změna výrazně snížila R_f vedlejšího amidinového produktu při zachování R_f hlavního produktu a umožnila tak dostatečné rozlišení obou produktů (viz Obrázek 12). K omezení vzniku vedlejšího produktu byl nadbytek aminu pro vázání HCl nahrazen indiferentní organickou bází (triethylaminem) a amin byl do reakční směsi přidáván postupně během asi 15 minut.

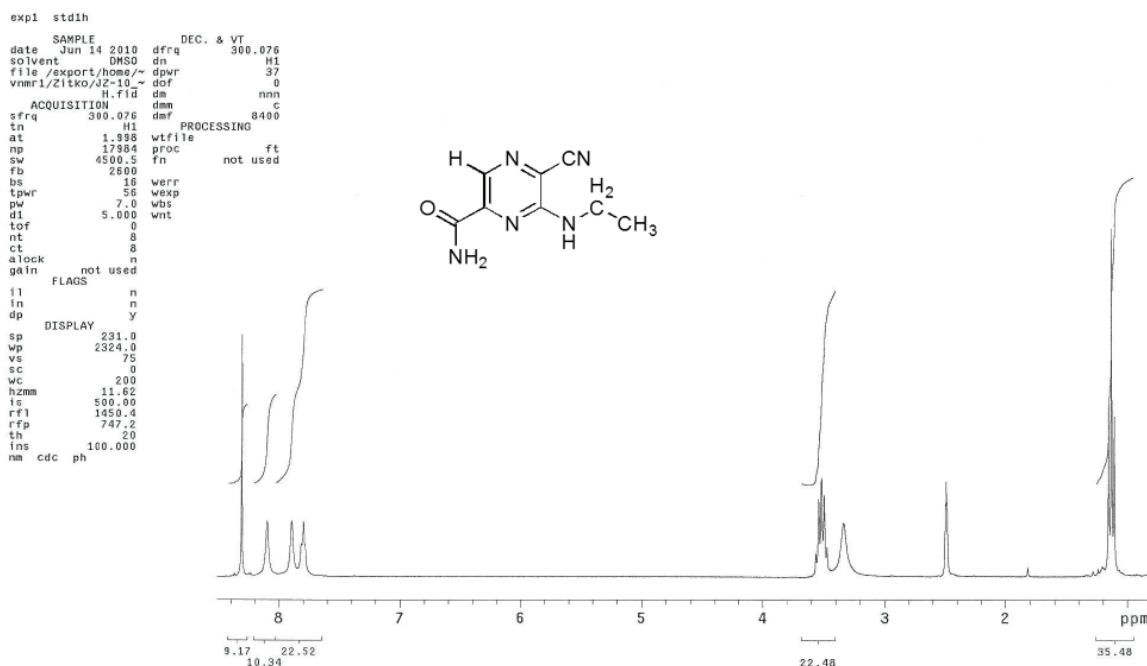
Obrázek 11: Struktura vedlejších amidinových produktů (a, b) a dalších teoreticky možných, avšak nepozorovaných produktů (c, d). Nejsou zobrazeny všechny možné kombinace.



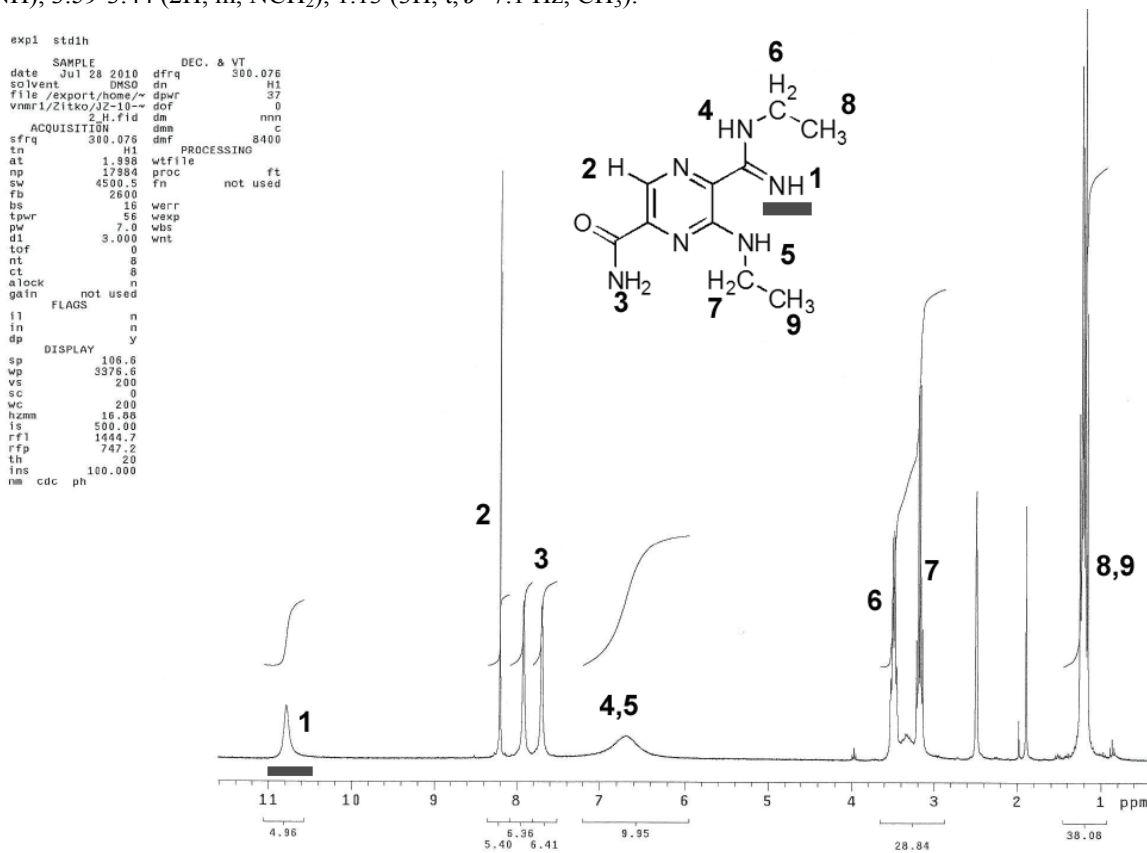
Obrázek 12: Výrazná změna retenčního faktoru amidinového vedlejšího produktu po modifikaci mobilní fáze 1 % (v/v) kys. octové. Mobilní fáze hexan : ethyl-acetát 1 : 2, chromatogram 1 bez kys. octové, chromatogram 2 s kys. octovou. **A** je cílený produkt, **B** amidinový vedlejší produkt, konkrétně ethylaminoderiváty označené v příloze [P3] jako látky 3 a 16.



Obrázek 13: Porovnání ^1H NMR spekter cíleného produktu a amidinového vedlejšího produktu. Měřeno v DMSO. V příloze [P3] jde o látky 3 a 16. Ve spektru amidinového vedlejšího produktu je možno pozorovat signál amidinového vodíku posunutý výrazně k nižšímu poli (10,79 ppm). Signály obou zbývajících vodíků NH v ethylaminovém seskupení splývají v široký singlet (6,70 ppm).



^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.31 (1H, s, H3), 8.10 (1H, bs, NH_2), 7.89 (1H, bs, NH_2), 7.80 (1H, t, $J=5.1$ Hz, NH), 3.59-3.44 (2H, m, NCH_2), 1.13 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3).



^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.79 (1H, bs, NH), 8.20 (1H, s, H3), 7.92 (1H, bs, NH_2), 7.70 (1H, bs, NH_2), 6.70 (2H, bs, NH), 3.49 (2H, q, $J=7.1$ Hz, NCH_2), 3.18 (2H, q, $J=7.1$ Hz, NCH_2), 1.22 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3), 1.18 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3).

5.2.3 Antimykobakteriální aktivita

Obě chlorované výchozí látky prokázaly zajímavou antimykobakteriální aktivitu, přičemž 6-chlor-5-kyanpyrazin-2-karboxamid efektivně inhiboval růst všech kmenů testovaných mykobaktérií při MIC = 25 µg/ml, což je hodnota srovnatelná s PZA (12,5 – 25 µg/ml) co se týče aktivity proti *M. tuberculosis* H37Rv. Velký význam má ale tato hodnota u ostatních kmenů *M. kansasii* a *M. avium*, neboť ty jsou vůči PZA přirozeně rezistentní. Obdobné zjištění učinil již Dlabal a kol. [141], který podobnou aktivitu našel u polohového isomeru - 3-chloro-5-kyanpyrazin-2-karboxamidu – kde MIC byla 12,5 µg/ml proti *M. tuberculosis* a 25 µg/ml proti *M. kansasii*. Tato účinnost chlorovaných derivátů proti mykobaktériím rezistentním na PZA nás vede k úvaze o jejich mechanismu účinku, který by se tak mohl lišit od účinku samotného PZA. Je známo, že některé 5-chlorované deriváty PZA účinkují prostřednictvím inhibice mykobakteriální FAS I, jak je o tom podrobně pojednáno v kapitole 3.3.2.

Při porovnávání antimykobakteriální aktivity u ostatních látek v obou sériích můžeme učinit tyto společné závěry o **SAR**: V homologických řadách methyloamino až oktylamino derivátů došlo nejprve po substituci krátkým alkylem (C1-C4) k přechodnému snížení nebo vymizení aktivity. S rostoucí délkou alkylového řetězce se aktivita opět objevila, aby shodně v obou sériích kulminovala u heptylamino substituovaného derivátu. U oktylamino derivátu aktivita opět mírně poklesla, i když toto mohlo být způsobeno zhoršenou rozpustností těchto látek v testovacím médiu. Cykloalkylamino substituce byly v obou sériích neúčinné. Rovněž tak substituce sekundárními aminy (včetně heterocyklického *N*-methylpiperazinu a morfolinu) byly neúčinné. To naznačuje význam zachování vodíku na alkyloaminové skupině a nevýhodnost zavedení substituentu typu terciárního aminu pro antimykobakteriální aktivitu. Tento vodík by mohl například hrát důležitou roli při nevazebných interakcích s potencionálním mykobakteriálním receptorem - enzymem.

V obou sériích (výrazněji v dinitrilové) se v alkyloamino homologických řadách vyskytla mírná aktivita proti MOTTs (tedy Mycobacteria Other Than Tuberculosis, v tomto případě myšleno *M. kansasii* a *M. avium*). V kyankarboxamidové řadě pouze u heptylamino substituce (MIC = 100 µg/ml), v dikarbonitrilové řadě u vícero látek s nejlepší hodnotou u 3-hexylaminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu (MIC = 50 µg/ml).

Doležal a kol. [164] připravili několik polohových isomerů aminokyanpyrazinkarboxamidů diskutovaných v této kapitole. Jednalo se o *N*-substituované deriváty 3-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů, tedy isomery lišící se pouze polohou

substituované aminoskupiny. Všechny připravené látky (substituce diethylamino, propylamino, dipropylamino, allylamino, diallylamino, butylamino, isobutylamino, dibutylamino, pyrrolidin-1-yl, piperidin-1-yl a morfolino) byly neaktivní. Látky substituované vyššími alkylaminy však nebyly připraveny. Přípravou hexylamino, heptylamino a oktylamino derivátů v Doležalově sérii (tedy období nejúčinnějších látek této kapitoly) by bylo v budoucnu možné zhodnotit vliv polohové isomerie těchto látek na jejich antimykobakteriální účinek. Výskyt aktivity pouze v jedné isomerní řadě by svědčil o možném specifickém účinku těchto látek (vazba na receptor), aktivita ve více řadách polohových isomerů by naopak naznačovala nesespecifický mechanismus účinku.

Závěry SAR:

- substituce chlorem rozšiřuje spektrum PZA na *M. avium* a *M. kansasii* (MOTTs)
- dikarbonitrily mírně účinnější než kyankarboxamidy vůči MOTTs
- důležitá role lipofility, kulminace aktivity u heptylamino derivátů, vyšší alkylamino deriváty problém s rozpustností v testovacím médiu
- substituce sekundárními aminy za vzniku terciárních aminů neúčinná
- substituce cykloalkylaminy vede k neúčinným látkám

5.2.4 Antifungální aktivita

Ze série dikarbonitrilů byla významně antifungálně účinná pouze výchozí látka, 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitril. Hodnoty MIC odečtené po 24 hod (72 pro *Trichophyton mentagrophytes*, TM) se pohybovaly od 7,8 do 31,5 $\mu\text{mol/l}$. Podobné hodnoty pro 3-chlorpyrazin-2,5-dikarbonitril publikoval již Palek [143], naše měření tedy potvrzuje již dříve publikovanou aktivitu této látky.

3-heptylaminopyrazin-2,5-dikarbonitril vykázal velmi selektivní aktivitu vůči *Trichophyton mentagrophytes* o hodnotě $\text{MIC}_{72\text{hod}} = 3,9 \mu\text{mol/l}$, zatímco pro ostatní testované druhy byla $\text{MIC}_{72\text{hod}} \geq 500 \mu\text{mol/l}$. 3-Diethylaminopyrazin-2,5-dikarbonitril inhiboval testované kmeny s $\text{MIC}_{24\text{hod}}$ v rozmezí 62,5 – 250 $\mu\text{mol/l}$. Aktivita ostatních testovaných látek byla v porovnání se standardy nulová nebo zanedbatelná.

5.2.5 Antimikrobiální aktivita

Žádná z látek těchto dvou sérií neprokázala antimykobakteriální aktivitu vůči testovaným kmenům.

5.2.6 Závěr

Zjištění slibné antimykobakteriální aktivity pozitivně závislé na prodlužování alkylaminového řetězce (rostoucí lipofilitě) nás inspirovalo ke konstrukci podobných sérií, ve kterých jsme výchozí chlorované sloučeniny (nebo jejich polohové isomery) substituovali lipofilnějšími benzylaminy s různou substitucí na fenylovém jádře. Chtěli jsme tak ověřit vliv dalšího zvýšení lipofility na antimykobakteriální aktivitu tohoto typu sloučenin. Dosud nepublikované výsledky z těchto sérií jsou uvedeny v příloze [P5], stručný komentář těchto výsledků potom tvoří následující kapitola 5.3.

5.3 Příprava a biologická aktivita 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů

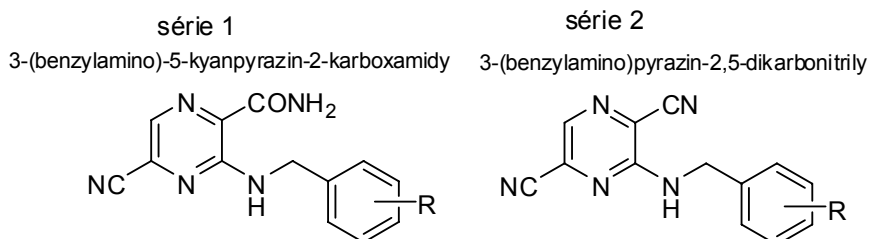
- v době odevzdání práce nepublikované výsledky

Následující kapitola uvádí stručný popis a komentář látek, které v době odevzdání práce nebyly publikovány. Některé údaje jsou proto z této části vyňaty a tvoří přílohu [P5]. V příloze čtenář nalezne především analytická data připravených sloučenin a úplné výsledky hodnocení antimykobakteriální aktivity.

Následující dvě série látek mají k sobě navzájem podobný vztah jako série komentované výše v kapitole 5.2 – liší se tedy navzájem pouze náhradou jedné karbonitrilové skupiny skupinou karboxamidovou. Důvody k přípravě těchto derivátů byly dvojí. U výše zmíněných sérií nearomaticky *N*-substituovaných aminokyanpyrazinkarboxamidů a aminopyrazindikarbonitrilů bylo pozorováno, že antimykobakteriální aktivita rostla se zvyšující se lipofilitou látek. Následující série jsou tedy primárně pokusem o další zvýšení lipofility zavedením alkylaromatického substituentu. Substituenty na aromatickém jádře byly pak voleny částečně dle Toplissova schématu [165] (4-Cl, 4-OCH₃, 4-CH₃, 3,4-Cl₂, 3-Cl), i když jsme byli omezeni dostupností jednotlivých benzylaminů. Druhým důvodem je strukturální analogie mezi těmito sériemi a antimykobakteriálně účinnými látkami z řad připravených v minulosti Doležalem (3-fenylamino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy, [166]) a Palkem (3-(fenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrily, [143]). Látky prezentované v této kapitole jsou tak strukturální analoga odvozená od předchozích vložení methylenového můstku –CH₂–.

5.3.1 Přehled připravených látek

V rámci následujících sérií bylo připraveno celkem 19 nových, předtím v literatuře nepopsaných struktur.

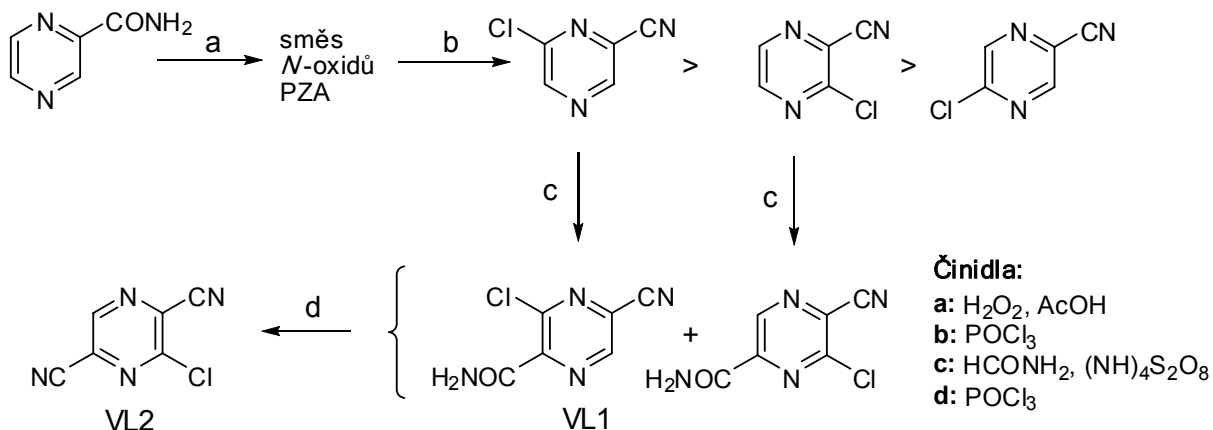


R = H, 4-CH₃, 4-OCH₃, 4-NH₂, 4-Cl, 3-Cl, 3,4-Cl₂, 3-NO₂, 3-CF₃, 2-CH₃

celkem 19 látek

5.3.2 Syntéza

Následující schéma zachycuje přípravu výchozích látek chlorovaných derivátů VL1 a VL2. Jak je patrné ze schématu, dikarbonitril VL2 je možné připravit hned ze dvou různých polohových isomerů chlorkyanpyrazinkarboxamidu, a obou těchto cest bylo využíváno. Prováděné reakce jsou popsány v literatuře [141, 142, 143].



Finální látky byly z VL1 a VL2 získány nukleofilní substitucí chloru za vybrané benzylaminy. Reakce byla prováděna v THF za přídavku K₂CO₃ pro vyvazování vznikajícího chlorovodíku. Pro většinu benzylaminů byla ke kompletaci reakce dostatečná laboratorní teplota a reakce byla dokončena za 20 – 30 minut (monitorováno na TLC). Pouze u benzylů substituovaných silně deaktivujícími skupinami (3-CF₃ a 3-NO₂) byla zapotřebí zvýšená teplota (reflux v THF). Finální látky byly čištěny flash chromatografií (silikagel, hexan : ethylacetát gradientová eluce 0 – 30 % ethylacetátu) a překrystalizovány ze soustavy voda – ethanol. Výtěžky (po dvojnásobném čištění) byly uspokojivé, v rozmezí 43 - 82 %. Další podrobnosti lze nalézt v příloze [P5].

5.3.3 Porovnání vypočítaných parametrů lipofility s experimentálně určeným log k

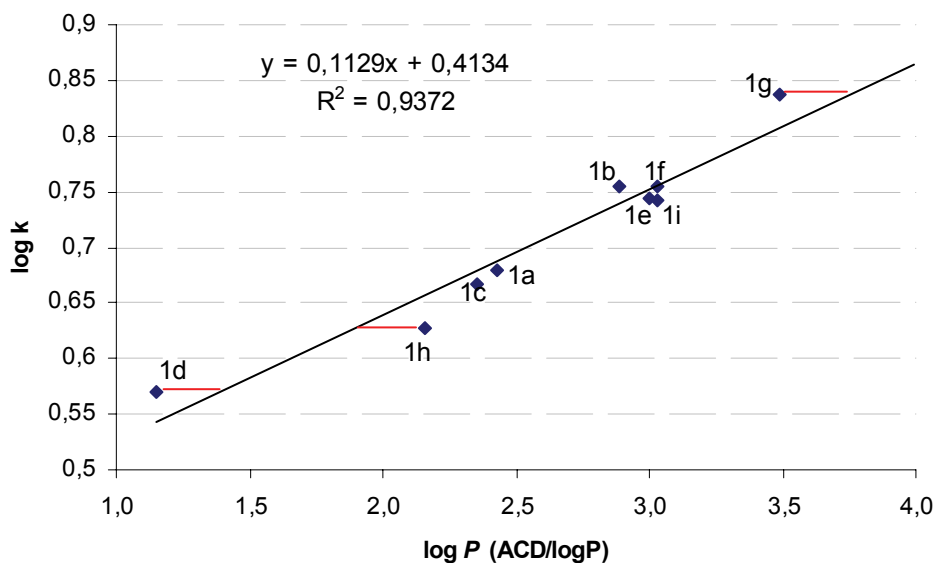
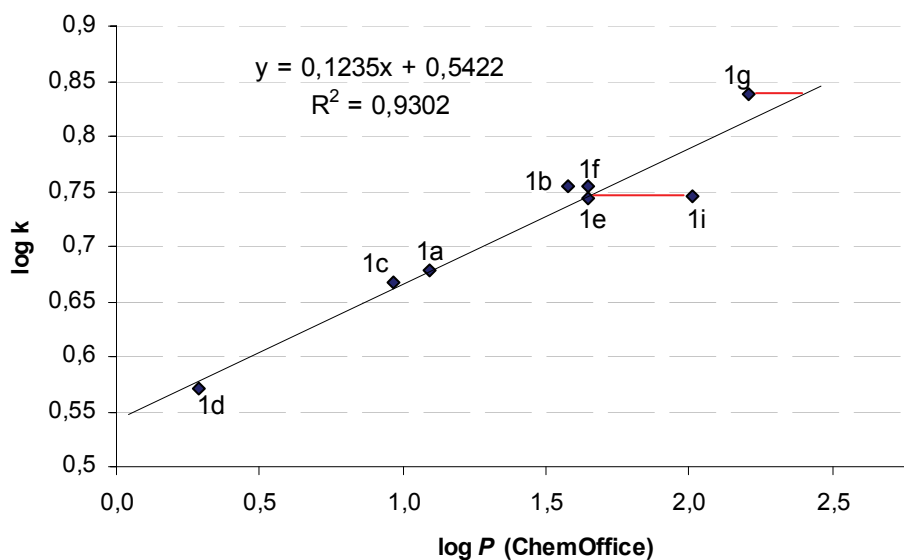
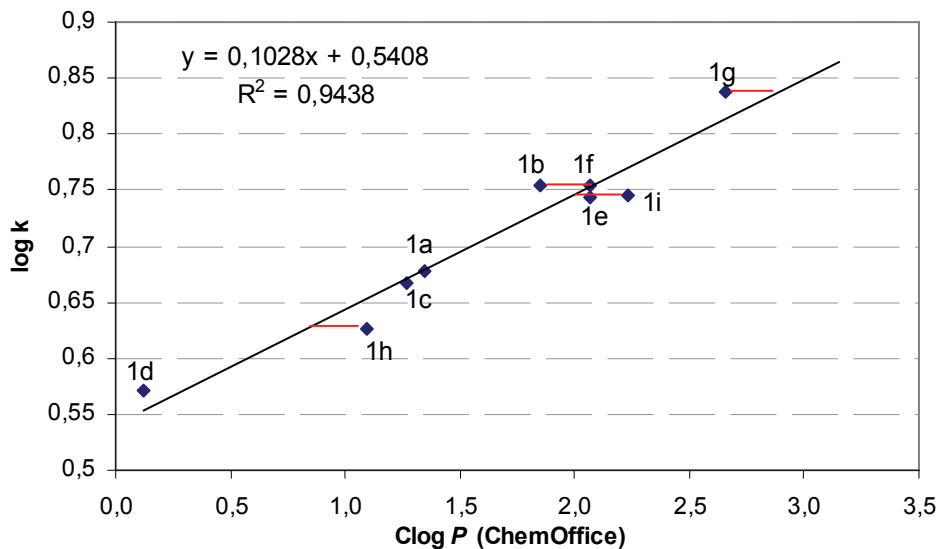
V obou sériích byla lipofilita připravených látek standardně vypočítána komerčně dostupným chemickým software (CS ChemOffice Ultra ver. 10.0, ACD/Log P ver. 1.0). Byly tak získány tři vypočítané parametry lipofility – logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda **log P** vypočtený CS ChemOffice, **log P** vypočtený ACD/Log P a dále logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda určeného na základě vazebných interakcí **Clog P** vypočtený CS ChemOffice. V sérii 1 byl navíc experimentálně změřen parametr

lipofility $\log k$, který byl odvozen z retenčního času během HPLC separace – podrobnosti viz příloha [P5].

Ke zjištění korelace vypočítaných parametrů v porovnání s experimentálně určeným $\log k$ byl použit následující postup. $\log k$ byl vyneseno do grafu (logaritmické měřítko) oproti jednotlivým vypočteným parametrům a byla provedena lineární regrese. V případě ideální shody by grafem byla přímka a rovnice regrese by byla určena s parametrem $R^2 = 1$. Parametr R^2 tak určuje schopnost výpočetního algoritmu produkovat výsledky korelující s experimentálně určenými daty.

Nejlepší korelace s experimentálními daty ($R^2 = 0,944$) byla zjištěna u parametru Clog P (CS ChemOffice), viz Obrázek 14. V případě $\log P$ (ACD/logP) bylo $R^2 = 0,937$ a v případě $\log P$ (CS ChemOffice) bylo $R^2 = 0,930$. Látky, u kterých jednotlivé algoritmy výrazně chybovaly při výpočtu lipofility, jsou na následujících grafech označeny červenými úsečkami, které odpovídají velikosti chyby. Nejčastěji docházelo k nadhodnocení lipofility 3-NO₂ derivátu (**1h**), nadhodnocení lipofility 3-CF₃ derivátu (**1i**) a naopak podhodnocení lipofility 3,4-Cl₂ derivátu (**1g**). Statisticky je za dobrý model považována korelace s koeficientem deteminace R^2 v intervalu (0,85 – 1). Je tedy obecně možné konstatovat, že všechny testované algoritmy vypočítaly lipofilitu v dobré shodě s experimentálně zjištěnými daty.

Obrázek 14: Korelace mezi vypočítaným parametry lipofility a experimentálně zjištěným log k v sérii 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů (série 1). Červené úsečky znázorňují výrazné odchylky od modelu korelace.



5.3.4 Antimykobakteriální aktivita

Následující odstavce popisují stručně antimykobakteriální aktivitu a zjištěné SAR v připravených sériích 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů. Antimykobakteriální aktivita byla závislá především na substituci aromatického jádra. Nebyla nalezena přímá závislost mezi lipofilitou těchto látek a jejich antimykobakteriální aktivitou. Úplné výsledky lze nalézt v příloze [P5].

Série 1

Pět látek typu 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů vykazovalo antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tbc* H37Rv srovnatelnou nebo lepší v porovnání s PZA. Aktivita se pohybovala v rozmezí 12,5 – 25 µg/ml, PZA vykazoval MIC = 6,25 – 12,5 µg/ml. Aktivními se ukázaly substituce v poloze 4 fenylového jádra elektrondonorovými substituenty (4-CH₃, 4-NH₂) nebo naopak v poloze 3 substituenty silně elektronakceptorovými (3-NO₂, 3-CF₃). Nesubstituované benzylové jádro bylo v této sérii neaktivní. Rovněž substituce benzylového jádra chlorem (3-Cl, 4-Cl, 3,4-Cl₂) vedla k neaktivním látkám. Žádná z připravených látek pak v testovaném rozsahu koncentrací nevykazovala aktivitu vůči MOTTs.

Série 2

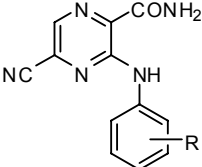
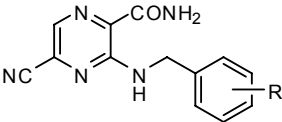
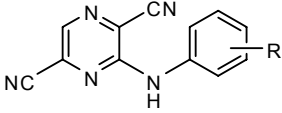
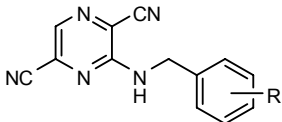
Série 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů přinesla pět látek aktivních proti *M. tbc* H37Rv v rozmezí MIC = 6,25 – 25 µg/ml. V souladu s předchozí sérií byly opět aktivní elektrondonorové substituenty v poloze 4 benzylového jádra (4-CH₃, 4-NH₂), naopak substituenty 3-CF₃ a 3-NO₂ byly v této sérii bez účinku. Na rozdíl od předchozí série zde byla zjištěna aktivita 3-Cl a 4-Cl substituovaných derivátů, které vykazaly i dobrou aktivitu proti *M. kansasii*. Dalším rozdílem v porovnání s předchozí sérií byla aktivita derivátu s nesubstituovaným benzylovým jádrem. Tato látka navíc inhibovala i ostatní testovaná mykobaktéria (*M. kansasii* a dva různé kmeny *M. avium*), její aktivita tedy byla v rozmezí MIC = 12,5 – 25 µg/ml vůči všem (tedy i vůči PZA rezistentním) testovaným kmenům. Můžeme ji tak proto označit za „vůdčí strukturu“ této série. Tato série také potvrzuje mírně zlepšenou účinnost pyrazindikarbonitrilů v porovnání s kyanpyrazinkarboxamidy vůči MOTTs. Toto bylo pozorováno i v sérii nearomaticky substituovaných látek (viz kapitola 5.2). Rovněž pyrazindikarbonitrily Palka a kol. [143] vykazovaly vesměs dobrou aktivitu proti MOTTs.

Při celkovém hodnocení antimykobakteriálního účinku je vhodné zohlednit násobně vyšší molekulovou hmotnost připravených látek v porovnání s PZA a INH. Vyjádřeno v molárních koncentracích, nejúčinnější látka těchto dvou sérií 3-(4-methylbenzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril (**2b**) byl dvakrát účinnější vůči *M. tuberculosis* v porovnání s PZA. 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril (**2a**) pak inhiboval růst všech testovaných mykobakteriálních kmenů s MIC [$\mu\text{mol/l}$] na úrovni standardů PZA a INH (viz příloha [P5], Tabulka 1).

Porovnání antimykobakteriální aktivity s aktivitou dříve připravených analog - zhodnocení efektu zavedení methylenového můstku

Doležal a kol. [166] v minulosti publikovali antimykobakteriální aktivitu v sérii 3-(fenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů, které se od základní struktury 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů (série 1) liší absencí methylenového spojovacího můstku mezi aminoskupinou a fenylovým jádrem. Podobně Palek a kol. [143] publikoval dobré antimykobakteriální aktivity 3-(fenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů, které jsou ve stejném vztahu k sérii 2. Základní porovnání aktivit původních sérií a sérií s vloženým methylenovým můstkem přináší Tabulka 7. K překryvům sérií 1 a 2 s původními sériemi Doležala a Palka ve smyslu stejné substituce aromatického jádra dochází pouze v několika případech (zvýrazněny tučně v tabulce).

Tabulka 7: Zhodnocení efektu zavedení methylenového můstku. Uvedená aktivita se vztahuje na *in vitro* hodnocení vůči *M. tuberculosis* H37Rv.

	[166] Doležal	aktivní substituce: R = H , 3-CH ₃ , 3-OH, 4-OH, 4-CH ₃ -3-NO ₂ MIC = 12,5 - 25 µg/ml
		neaktivní substituce: R = 2,6-(CH ₃) ₂ , 3-Br, 4-Cl , 3,5-(CF ₃) ₂ , 3-OCH ₃
	[P5] série 1	aktivní substituce: R = 4-CH ₃ , 4-NH ₂ , 3-NO ₂ , 3-CF ₃ MIC = 12,5 - 25 µg/ml
		neaktivní substituce: R = H , 4-OCH ₃ , 3-Cl, 4-Cl , 3,4-Cl ₂
	[143] Palek	aktivní substituce: R = 3-Cl , 4-F, 2-OH-4-NO ₂ , 2-CF ₃ , 3-CF₃ MIC = 8 - 16 µg/ml
		neaktivní substituce: R = 3,5-Br ₂ -4-OH
	[P5] série 2	aktivní substituce: R = H, 4-CH ₃ , 4-NH ₂ , 3-Cl , 4-Cl MIC = 6,25 - 25 µg/ml
		neaktivní substituce: R = 3,4-Cl ₂ , 3-NO ₂ , 3-CF₃ , 2-CH ₃

K úplnému posouzení vlivu zavedení methylenového můstku v těchto sériích by bylo třeba zhodnotit aktivitu více dvojic se stejnou substitucí aromatického jádra. Některé obecné závěry je však možné formulovat. I když v některých případech (Doležal R = H, Palek R = CF₃) došlo zavedením methylenového můstku ke ztátě antimykobakteriální aktivity vůči *M. tuberculosis* H37Rv, v jiných případech byla aktivita zachována (Palek R = 3-Cl). V obou skupinách (s methylenovým můstkem i bez něj) byla u mnohých látek zjištěna dobrá aktivita, je tedy možno uzavřít, že zavedení methylenového můstku do těchto molekul není primárně spojeno se ztrátou aktivity vůči *M. tuberculosis* H37Rv.

6 Závěr

Úvodní část práce se zabývala tuberkulózou (TBC) jako nemocí se zaměřením na současnou epidemiologickou situaci ve světě. Byly popsány rizikové faktory představované především rostoucí rezistencí vůči používaným antituberkulotikům a koinfekcí TBC s HIV. Byl podán přehled v současnosti používaných antituberkulotik první a druhé linie jakož i látek nacházejících se ve fázi klinického testování. Byly popsány základní terapeutické režimy a strategie užívané k léčení citlivých i rezistentních forem TBC.

Poznání mechanismů účinku derivátů POA s antimykobakteriální aktivitou je důležitým předpokladem pro racionální vývoj nových antituberkulotik této struktury. Pyrazinamid (PZA) je jediným klinicky používaným antituberkulotikem odvozeným od kys. pyrazinkarboxylové (POA), proto mu v této práci byla věnována náležitá pozornost. Byly prezentovány teorie popisující antimykobakteriální účinek PZA - všeobecně uznávaná teorie založená na nespecifickém účinku uvolňované POA i teorie přiznávající PZA, POA nebo jiným derivátům účinek specifický, zaměřený na konkrétní subcelulární cíl. V další části podala tato práce farmaceuticko-chemicky zaměřený přehled strukturních obměn PZA/POA prováděných v minulosti ve snaze o získání nových antimykobakteriálně účinných látek.

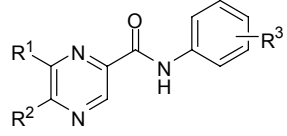
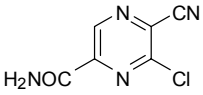
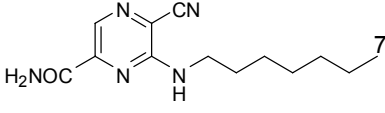
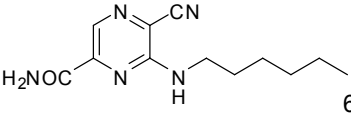
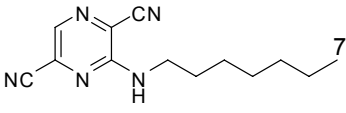
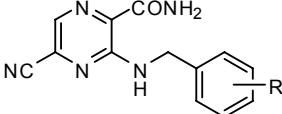
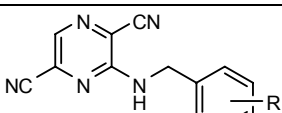
V rámci praktické části této práce bylo připraveno celkem 76 derivátů PZA/POA, z toho 68 nových, v literatuře do té doby nepopsaných, látek. Jednalo se o anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny, nearomaticky *N*-substituované 6-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy a 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrily, 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrily. Všechny připravené látky byly testovány na *in vitro* antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* H37Rv a většina i proti *M. kansasii* a dvěma různým kmenům *M. avium*. Ve všech skupinách připravených látek se vyskytly deriváty s *in vitro* antimykobakteriální aktivitou proti *M. tuberculosis* srovnatelnou nebo lepší v porovnání s PZA (MIC = 6,25 – 25 µg/ml). Při zohlednění vyšší molekulové hmotnosti připravených látek v porovnání s PZA byly některé látky i dvakrát účinnější než PZA (vyjádřeno jako MIC [µmol/l]). Tabulka 8 uvádí přehled látek s nejlepší aktivitou. Byly identifikovány i nové struktury s dobrým účinkem vůči atypickým mykobaktériím *M. kansasii* a *M. avium* rezistentním vůči PZA, viz Tabulka 9. Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v jednotlivých sériích byly diskutovány výše.

N-substituované 6-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy a 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrily byly rovněž doplňkově testovány na antifungální a antibakteriální aktivitu vůči

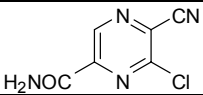
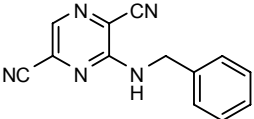
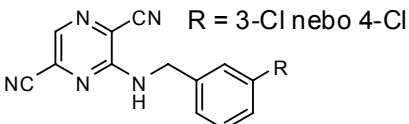
vybraným lidským patogenům. Byla zjištěna pouze ojedinělá antifungální aktivita, za pozornost stojí selektivní aktivita heptylaminopyrazin-2,5-dikarbonitrilu vůči *Trichophyton mentagrophytes* ($MIC_{72\text{hod}} = 3,9 \mu\text{mol/l}$, pro ostatní testované druhy $MIC > 500 \mu\text{mol/l}$). Nebyla zjištěna žádná antibakteriální aktivita.

Připravené látky obohatily paletu derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny připravených v minulých letech na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Tato práce je součástí dlouhodobého vědeckého záměru katedry Farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Byly identifikovány nové antimykobakteriálně aktivní struktury, které se mohou stát výchozími látkami pro další optimalizační studie.

Tabulka 8: Přehled látek s nejlepší *in vitro* aktivitou proti *M. tuberculosis* H37Rv. Vyjádřeno jako MIC [$\mu\text{g/ml}$] nebo jako procento inhibice růstu při koncentraci 6,25 $\mu\text{g/ml}$ (TAACF). v závorce uveden přepočítaný MIC [$\mu\text{mol/l}$] vždy pro neúčinnější látku dané skupiny.

	R ¹	R ²	R ³	Aktivita	Odkaz
	Cl	H	4-Cl	65 % při 6,25 $\mu\text{g/ml}$	[P2]
	Cl	H	3,4-Cl ₂	61 % při 6,25 $\mu\text{g/ml}$	[P2]
	Cl	(CH ₃) ₃ C-	3-I-4-CH ₃	MIC ₉₀ = 0,819 $\mu\text{g/ml}$ (TAACF)	[P1]
				25 $\mu\text{g/ml}$ (68 $\mu\text{mol/l}$)	[P3]
 7				12,5 $\mu\text{g/ml}$ (48 $\mu\text{mol/l}$)	[P3]
 6					
 7	a také oktylamino a hexylamino analog			12,5 - 25 $\mu\text{g/ml}$ (51 $\mu\text{mol/l}$)	[P4]
	R = 4-CH ₃ , 4-NH ₂ , 3-NO ₂ , 3-CF ₃			12,5 - 25 $\mu\text{g/ml}$ (47 $\mu\text{mol/l}$)	[P5]
	R = H, 4-CH ₃ , 4-NH ₂ , 3-Cl, 4-Cl			6,25 - 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (25 $\mu\text{mol/l}$)	[P5]
PZA 6,25 – 25 $\mu\text{g/ml}$ (50 – 203 $\mu\text{mol/l}$)					

Tabulka 9: Látky s významnou *in vitro* aktivitou proti atypickým mykobaktériím. Aktivita vyjádřena jako MIC [$\mu\text{g/ml}$], v závorce přepočítaný MIC [$\mu\text{mol/l}$].

Struktura	<i>M. kansasii</i> (a)	<i>M. avium</i> (b)	<i>M. avium</i> (c)	Odkaz
	25 (137)	25 (137)	25 (137)	[P3]
	25 (106)	25 (106)	12,5 (53)	[P5]
 R = 3-Cl nebo 4-Cl	12,5 (46)	>100	>100	[P5]
PZA	>200	>200	>200	[P3, P4]
INH	12,5 - 25 (91-182)	6,25 – 12,5 (46-91)	3,13 – 6,25 (23-46)	[P3, P4]

a) CNCTC My 235/80, b) CNCTC My 80/72, c) CNCTC My 152/73

7 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Jan Zitko

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

Název disertační práce: Deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika (příprava a studium biologických vlastností)

Tato práce se zabývá deriváty kyseliny pyrazin-2-karboxylové (POA) s potencionálním antimykobakteriálním účinkem. V teoretické části práce je kromě stručného popisu tuberkulózy (TBC) jako nemoci popsána epidemiologická situace TBC v celosvětovém měřítku a přidružené rizikové faktory této nemoci v podobě rostoucí rezistence k antituberkulotikům první linie a koinfekce s virem HIV. Dále jsou popsána v současnosti klinicky používaná antituberkulotika a podán přehled nových antituberkulotik v klinické fázi testování. Zvláštní pozornost je věnována pyrazinamidu (PZA), který se uplatňuje jako jedno z nejdůležitějších antituberkulotik první linie. Práce rovněž popisuje současné teorie mechanismu účinku PZA (POA). Důležitou částí této práce je přehled strukturních obměn PZA/POA prováděných v minulosti ve snaze o přípravu nových látek s antimykobakteriálním účinkem a zhodnocení prospěšnosti a významu těchto obměn.

V rámci praktické části této práce bylo připraveno celkem 76 derivátů PZA/POA, z toho 68 nových, v literatuře do té doby nepopsaných, látek. Jednalo se o anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny, nearomaticky *N*-substituované 6-amino-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy a 3-aminopyrazin-2,5-dikarbonitrily, 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidy a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrily. Všechny připravené látky byly testovány na *in vitro* antimykobakteriální aktivitu vůči *M. tuberculosis* H37Rv a většina i proti *M. kansasii* a dvěma různým kmenům *M. avium*. Ve všech skupinách připravených látek se vyskytly deriváty s *in vitro* antimykobakteriální aktivitou proti *M. tuberculosis* srovnatelnou nebo mírně lepší v porovnání s PZA (MIC = 6,25 – 25 µg/ml). Několik látek pak vykazovalo aktivitu i proti *M. kansasii* a *M. avium*. V jednotlivých sériích byly diskutovány vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou daných látek i se zařazením do kontextu s dříve připravenými analogy podobných struktur.

Některé látky byly rovněž testovány na antifungální a antibakteriální aktivitu vůči vybraným lidským oportunním patogenům. U testovaných látek nebyla až na několik výjimek zjištěna významná antifungální aktivita. Žádná z testovaných látek nevykazovala antibakteriální aktivitu vůči testovaným kmenům.

Výsledky této disertační práce jsou příspěvkem k dlouhodobému výzkumnému záměru katedry Farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové zaměřenému na studium nových antituberkulotik odvozených od PZA (POA).

8 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Dpt. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Jan Zitko

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

Title of Doctoral Thesis: Derivatives of pyrazinecarboxylic acid as potential antituberculotics (synthesis and biological evaluation)

This thesis deals with derivatives of pyrazine-2-carboxylic (POA) acid with potential antimycobacterial activity. In the theoretical part of the thesis there is a short description of tuberculosis (TB) disease, discussion of its epidemiology and associated risk factors of increasing resistance to first-line antituberculars and the co-infection with HIV. Antituberculars used in clinical practice are described as well as the summary of new antituberculars under clinical trials is presented. Pyrazinamide (PZA) as one of the most important first-line antituberculars is in the focus of this thesis. Multiple up-to-date theories of PZA (POA) mechanism of action are described and discussed. Importantly, a summary of structural changes of PZA/POA attempted in the past to prepare new antituberculars is presented and the importance and relevance of individual structural changes is discussed.

In the practical part of this thesis, 76 derivatives of PZA/POA were prepared, 68 of them were new compounds not described in the scientific literature. The prepared compounds fall into several groups of pyrazine-2-carboxylic acid anilides, non-aromatically *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides and 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles, 3-(benzylamino)-5-cyanopyrazine-2-carboxamides and 3-(benzylamino)pyrazine-2,5-dicarbonitriles. All prepared compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and most of them against *M. kansasii* and two different strains of *M. avium* as well. In all of the structural groups proposed above, at least some compounds exerted activity of PZA or slightly better (MIC = 6,25 – 25 µg/mL against *M. tuberculosis*). Few compounds were active even against the strains of *M. kansasii* and *M. avium*. The relationships between the structure and antimycobacterial activity are discussed within the series of compounds with the respect to previously prepared analogues of similar structure.

Some of the compounds were tested even for antifungal and antibacterial activity against selected human pathogens. None of the tested compounds exerted any antibacterial activity. Antifungal activity was negligible with few exceptions.

The results of this doctoral thesis contribute to the long-term research objectives of the Dpt. of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control focused on the development of new potential antituberculars derived from PZA (POA).

9 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

Články v recenzovaných časopisech a kapitola z monografie:

[P1] DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; KEŠETOVIČOVÁ, D.; KUNEŠ, J.; SVOBODOVÁ, M. Substituted *N*-Phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. *Molecules*. 2009; vol. 14, no. 10, p. 4180–4189. [ISSN 1420-3049], DOI:10.3390/molecules14104180. IF₂₀₀₉ = 1.738.

[P2] DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; OSIČKA, Z.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; VEJSOVÁ, M.; DOHNAL, J.; JAMPÍLEK, J.; KRÁĀOVÁ, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, 2010, vol. 15, no. 12, p. 8567–8581. IF₂₀₁₀ = 1.988 [ISSN 1420-3049], DOI:10.3390/molecules15128567. IF₂₀₀₉ = 1.738.

[P3] ZITKO, J.; DOLEŽAL, M.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; KUČERA, R.; JÍLEK, P. Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, vol. 19, no. 4, p. 1471–1476. [ISSN 0968-0896], DOI:10.1016/j.bmc.2010.12.054. IF₂₀₁₀ = 2.978.

[P6] DOLEŽAL, M.; KEŠETOVIČ, D.; ZITKO, J. Antimycobacterial evaluation of pyrazinecarboxylic acid derivatives. *Curr. Pharm. Design*, 2011, vol. 17, s. 3506-3514. [ISSN 1381-6128]. IF₂₀₁₀ = 4.774.

[P7] DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; JAMPÍLEK, J. Pyrazinecarboxylic acid derivatives with antimycobacterial activity. Chapter, in press. In “*Mycobacterium Tuberculosis*“ by Pere-Joan Cardona (ed.), 1st ed., Vienna, InTech, 2011, in press. [ISBN 978-953-307-1029-3].

[P8] DOLEŽAL, M.; OPLETALOVÁ, V.; BAGI-KRINKOVÁ, J.; KUČEROVÁ-CHLUPÁČOVÁ, M.; JAMPÍLEK, J.; PALEK, L.; KEŠETOVIČOVÁ, D.; ZITKO, J. Development of new antituberculous active pyrazines evaluated in co-operation with TAACF program within a period of 15 years. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 2010, vol. 39, no. 1, p. 31–40. [ISSN 1210-9495].

Elektronické publikace:

DOLEŽAL, M.; OSIČKA, Z.; **ZITKO, J.**; KUNEŠ, J.; JAMPÍLEK, J.; VEJSOVÁ, M.; BUCHTA, V.; KRÁLOVÁ, K. Substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides, Their Synthesis, Hydro-lipophilic Properties and Evaluation of Their Antimycobacterial, Antifungal and Photosynthesis-inhibiting Activity. The 14th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, Presented in Section B, Bioorganic, Medicinal and Natural Products Chemistry, November, 1st – 30th, 2010, <http://www.sciforum.net/presentation/380> Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, [ISBN 3-906980-19-7] Published in 2010 by MDPI, Basel, Switzerland.

DOLEŽAL, M.; **ZITKO, J.**; CARILLO, C.; EIBINOVÁ, D.; TAUCHMAN, M.; KUNEŠ, J.; PATEROVÁ, P.; PEŠKO, M.; KRÁLOVÁ, K. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides, Their Synthesis, Hydro-lipophilic Properties and Evaluation of Their Antimycobacterial, and Photosynthesis-inhibiting Activity. The 15th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, Presented in Section B, Bioorganic, Medicinal and Natural Products Chemistry, November, 1st – 30th, 2011, <http://www.sciforum.net/presentation/> Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, [ISBN 3-906980-25-1] Published in 2011 by MDPI, Basel, Switzerland. In Proceedings of the 15th Int. Electron. Conf. Synth. Org. Chem., 1-30 November 2011; Sciforum Electronic Conferences Series, 2011.

Přednášky:

ZITKO, J.; DOBROVOLNÝ, L.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; DOLEŽAL, M. Synthesis and antimycobacterial properties of some pyrazinamide analogues. 1. Postgraduální vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové 2011.

ZITKO, J.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; DOLEŽAL, M. Synthesis and antimycobacterial properties of some pyrazinamide analogues. Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Universidad de Alcalá, Universidad Complutense de Madrid and Universidad San Pablo CEU. Madrid 2011.

ZITKO, J.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; PATEROVÁ, P.; DOLEŽAL, M. Synthesis and antimycobacterial properties of new pyrazinamide analogues. Snytěza a analýza léčiv. Brno 2011.

DOLEŽAL, M.; OPLETALOVÁ, V.; KEŠETOVICHOVÁ, D.; **ZITKO, J.** Synthesis of antituberculous active pyrazines and their evaluation in co-operation with TAACF program within a period of 15 years. Přednáška na konferenci Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, Slovinsko, 24. až 25. září 2009, Sborník abstraktů, s. 12. [ISBN 978-961-248-174-2].

Plakátová sdělení:

ZITKO, J.; KEŠETOVICHOVÁ, D.; DOLEŽAL, M.; VEJSOVÁ, M. Syntéza analogů pyrazinamidu s potenciální antituberkulotickou a antimykotickou aktivitou. Sborník abstrakt 38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, 14. až 16. září 2009, s. 163, P-101. [ISBN 978-80-7305-078-8].

ZITKO, J.; DOBROVOLNÝ, L.; DOLEŽAL, M.; VEJSOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, M. Synthesis and anti-infective properties of some pyrazinamide analogues. Book of Abstracts: The XXIst International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC 2010), Brussels, Belgium, September 5-9, 2010, Drug Future 2010, vol. 35, no. Suppl. A, 167 (PO-250), http://www.ldorganisation.com/data/1283192286EFMC-ISMC_Book_of_Abstracts.pdf. [ISSN 0377-8282, IF₂₀₀₉ = 0.500].

ZITKO, J.; KEŠETOVICHOVÁ, D.; DOLEŽAL, M.; VEJSOVÁ, M. Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Properties of Pyrazinamide Analogues. Book of Abstracts from Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 24-27 June, 2009, Budapest, Hungary, p. 81, P-19. [ISBN 978-963-9319-95-0].

DOLEŽAL, M.; PLASOVÁ, P.; KEŠETOVICHOVÁ, D.; **ZITKO, J.;** VEJSOVÁ, M. Design, Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Properties of Pyrazinamide Analogues. Book of Abstracts from Hungarian-Austrian-Czech-German-Greek-Italian-Polish-Slovak-Slovenian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, 24-27 June, 2009, Budapest, Hungary, p. 67, P-5. [ISBN 978-963-9319-95-0].

DOLEŽAL, M.; **ZITKO, J.;** LEŠŇANSKÁ, K.; VEJSOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, M. Preparation, antimycobacterial, and antifungal evaluation of some anilides of substituted pyrazinecarboxylic acid. 1st TURKISH - RUSSIAN JOINT MEETING ON ORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY, Antalya, Turkey, on October 14-17, 2009. Book of Abstracts p. 54—55.

DOLEŽAL, M.; SVOBODOVÁ, M.; **ZITKO, J.**; JANĎOUREK, O.; EIBINOVÁ, D. Development of antimycobacterial active substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. Book of Abstracts from the 31st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, July 4-7, 2010, Bled, Slovenia, PP-123, p. 215. [ISBN 978-961-6633-28-4].

DOLEŽAL, M.; JAMPÍLEK, J.; **ZITKO, J.**; OSIČKA, Z.; SERVUSOVÁ, B. Structure-property Relationships in Series of Chlorine-substituted Pyrazinecarboxanilides as Biologically Active Compounds. Book of Abstracts: The XXIst International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC 2010), Brussels, Belgium, September 5-9, 2010, Drug Future 2010, vol. 35, no. Suppl. A, 76 (PO-60), http://www.ldorganisation.com/data/1283192286EFMC-ISMC_Book_of_Abstracts.pdf. [ISSN 0377-8282, IF₂₀₀₉ = 0.500].

DOLEŽAL, M.; KEŠETOVIČOVÁ, D.; **ZITKO, J.** Structure-activity relationships in series of ring-substituted pyrazinecarboxamides. Sborník abstrakt 38. konference Syntéza a analýza léčiv, Hradec Králové, 14. až 16. září 2009, s. 77, P-15. [ISBN 978-80-7305-078-8].

DOLEŽAL, M.; KEŠETOVIČOVÁ, D.; **ZITKO, J.** Vývoj syntézy vybraných farmaceutických substancí asistované mikrovlnami. Sborník 44. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 27. až 29. listopadu 2009, in Chem. Listy, 2009, vol. 103, no. 11, s. 946. [ISSN 0009-2770, IF₂₀₀₈ = 0,593].

DOLEŽAL, M.; EIBINOVÁ, D.; **ZITKO, J.**; PATEROVÁ, P. Synthesis and Antimycobacterial Evaluation of Substituted Pyrazinecarboxamides. Sborník abstrakt 40. konference Syntéza a analýza léčiv, Brno 2011.

10 Seznam použité literatury

1. HERSHKOVITZ, I.; DONOGHUE, H.D.; MINNIKIN, D.E. et al. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old Mycobacterium tuberculosis from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE*. 2008, vol. 3, no. 10, s. e3426. ISSN 1932-6203.
2. ZINK, A.R.; SOLA, C.; REISCHL, U. et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *Journal of clinical microbiology*. 2003, vol. 41, no. 1, s. 359-367. ISSN 0095-1137.
3. GREENWOOD, David, et al. *Lékařská mikrobiologie : Přehled infekčních onemocnění: patogenze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1. české. Praha : Grada Publishing, 1999. Mykobakterie, s. 215-219. ISBN 80-7169-365-0.
4. NESTER, Eugene W., et al. *Microbiology : A Human Perspective*. 2nd ed. Boston (Massachusetts) : WCB/McGraw-Hill, 1998. Lower Respiratory System Infections, s. 535-539. ISBN 0-697-28602-9.
5. ALSTEENS, D.; VERBELEN, C.; DAGUE, E. et al. Organization of the mycobacterial cell wall : a nanoscale view. *Pflügers Archiv*. 2008, vol. 456, no. 1, s. 117-125. ISSN 0031-6768.
6. TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G.S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. *Clinical microbiology reviews*. 2005, vol. 18, no. 1, s. 81-101. ISSN 0893-8512.
7. COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.. *Nature*. 1998, vol. 393, no. 6685, s. 537-544. ISSN 0028-0836.
8. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008. WHO document no. WHO/HTM/TB/2008.39. 2008. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/pdf/fullreport.pdf>. ISBN 978 92 4 156354.
9. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009. WHO document no. WHO/HTM/TB/2009.411. 2009. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf>. ISBN 978 92 4 156380 2.
10. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. WHO document no. WHO/HTM/TB/2009.426. 2009. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598866_eng.pdf>. ISBN 978 92 4 159886 6.
11. Global tuberculosis report: WHO report 2010. WHO document no. WHO/HTM/TB/2010.7. 2010. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf>. ISBN 978 92 4 156406 9.
12. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO document no. WHO/HTM/TB/2011.16. 2011. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://www.who.int/entity/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf>. ISBN 978 92 4 156438 0.
13. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. 2010. Dostupné z www na <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf>. WHO/HTM/TB/2010. ISBN 978 92 4 159919 1

14. Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed. WHO document no. WHO/HTM/TB/2009.420. 2010, s. 30. Elektronická verze ve formátu PDF dostupná také z WWW: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf>. ISBN 978 92 4 154783 3.
15. ANANDAIAH, A. Novel Developments in the Epidemic of Human Immunodeficiency Virus and Tuberculosis Coinfection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011, vol. 183, no. 8, s. 987-997. ISSN 1073-449X.
16. DATTA, M.; RADHAMANI, M.P.; SELVARAJ, R. et al. Critical-assessment of smear-positive pulmonary tuberculosis patients after chemotherapy under the district tuberculosis program. *Tubercle and lung disease*. 1993, vol. 74, no. 3, s. 180-186. ISSN 0962-8479.
17. JOHNSON, K.; KING, D.S.; SCHULTZ, P.G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society*. 1995, vol. 117, no. 17, s. 5009-5010. ISSN 0002-7863.
18. LEI, B.F.; WEI, C.J.; TU, S.C. Action mechanism of antitubercular isoniazid - Activation mycobacterium tuberculosis KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor. *Journal of biological chemistry*. 2000, vol. 275, no. 4, s. 2520-2526. ISSN 0021-9258.
19. DUCASSE-CABANOT, S.; COHEN-GONSAUD, M.; MARRAKCHI, H. et al. In vitro inhibition of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA by isoniazid. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004, vol. 48, no. 1, s. 242-249. ISSN 0066-4804.
20. ARGYROU, A.; VETTING, M.W.; ALADEGBAMI, B. et al. Mycobacterium tuberculosis dihydrofolate reductase is a target for isoniazid. *Nature structural & molecular biology*. 2006, vol. 13, no. 5, s. 408-413. ISSN 1545-9993.
21. JANIN, Y. Antituberculosis drugs : Ten years of research. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007, vol. 15, no. 7, s. 2479-2513. ISSN 0968-0896.
22. SHI, R.; ITAGAKI, N.; SUGAWARA, I. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanisms. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2007, vol. 7, no. 11, s. 1177-1185. ISSN 1389-5575.
23. CAMPBELL, E.A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. 2001, vol. 104, no. 6, s. 901-912. ISSN 0092-8674.
24. WOLUCKA, B.A.; MCNEIL, M.R.; DEHOFFMANN, E. et al. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *Journal of biological chemistry*. 1994, vol. 269, no. 37, s. 23328-23335. ISSN 0021-9258.
25. MIKUSOVA, K.; SLAYDEN, R.A.; BESRA, G.S. et al. Biogenesis of the mycobacterial cell-wall and the site of action of ethambutol. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995, vol. 39, no. 11, s. 2484-2489. ISSN 0066-4804.
26. FORBES, M.; KUCK, N.A.; PEETS, E.A. et al. Effect of ethambutol on nucleic acid metabolism in mycobacterium smegmatis and its reversal by polyamines and divalent cations. *Journal of bacteriology*. 1965, vol. 89, no. 5, s. 1299-1305. ISSN 0021-9193.
27. CHEEMA, S.; ASOTRA, S.; KHULLER, G.K. Ethambutol induced leakage of phospholipids in mycobacterium-smegmatis. *IRCS medical science. Biochemistry*. 1985, vol. 13, no. 9, s. 843-844. ISSN 0305-6708.

28. PAULIN, L.G.; BRANDER, E.E.; POSO, H.J. Specific-inhibition of spermidine synthesis in mycobacteria spp by the dextro isomer of ethambutol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1985, vol. 28, no. 1, s. 157-159. ISSN 0066-4804.
29. LETY, M.A.; NAIR, S.; BERCHE, P. et al. A single point mutation in the embB gene is responsible for resistance to ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997, vol. 41, no. 12, s. 2629-2633. ISSN 0066-4804.
30. HARTL, Jiří et al. *Farmaceutická chemie IV*. 1.vydání. Praha : Karolinum, 2006. Aminoglykosidová antibiotika, s. 99-104. ISBN 80-246-1169-4.
31. CARTER, A.P.; CLEMONS, W.M.; BRODERSEN, D.E. et al. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*. 2000, vol. 407, no. 6802, s. 340-348. ISSN 0028-0836.
32. BEGG, E.J.; BARCLAY, M.L. Aminoglycosides - 50 years on. *British journal of clinical pharmacology*. 1995, vol. 39, no. 6, s. 597-603. ISSN 0306-5251.
33. JARLIER, V.; NIKAIIDO, H. Mycobacterial cell-wall - structure and role in natural-resistance to antibiotics. *FEMS microbiology letters*. 1994, vol. 123, no.1-2, s. 11-18. ISSN 0378-1097.
34. MAILAENDER, C.; REILING, N.; ENGELHARDT, H. et al. The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2004, vol. 150, no. 4, s. 853-864. ISSN 1350-0872.
35. KANEKO, T.; COOPER, C.; MDLULI, K. Challenges and opportunities in developing novel drugs for TB. *Future medicinal chemistry*. 2011, vol. 3, no. 11, s. 1373-1400. ISSN 1756-8919.
36. AKBERGENOV, R.; SHCHERBAKOV, D.; MATT, T. et al. Molecular Basis for the Selectivity of Antituberculosis Compounds Capreomycin and Viomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011, vol. 55, no. 10, s. 4712-4717. ISSN 0066-4804.
37. RASTOGI, N.; GOH, K.S.; DAVID, H.L. Enhancement of drug susceptibility of mycobacterium-avium by inhibitors of cell-envelope synthesis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1990, vol. 34, no. 5, s. 759-764. ISSN 0066-4804.
38. BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A. et al. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium-tuberculosis*. *Science*. 1994, vol. 263, no. 5144, s. 227-230. ISSN 0036-8075.
39. DEBARBER, A.E.; MDLULI, K.; BOSMAN, M. et al. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000, vol. 97, no. 17, s. 9677-9682. ISSN 0027-8424.
40. VANNELLI, T.A.; DYKMAN, A.; MONTELLANO, P.R.O. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *Journal of biological chemistry*. 2002, vol. 277, no. 15, s. 12824-12829. ISSN 0021-9258.
41. LEHMANN, J. Para-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. *Lancet*. 1946, vol. 250, no. JAN5, s. 15-16. ISSN 0140-6736.
42. ARBEX, M.A.; VARELLA, M.C.L.; SIQUEIRA, H.R. et al. Antituberculosis drugs : Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second line drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2010, vol. 36, no. 5, s. 641-656. ISSN 1806-3713.

43. HARTL, Jiří et al. *Farmaceutická chemie IV*. 1.vydání. Praha : Karolinum, 2006. Antituberkulotika, s. 121. ISBN 80-246-1169-4.
44. RENGARAJAN, J.; SASSETTI, C.M.; NARODITSKAYA, V. et al. The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular microbiology*. 2004, vol. 53, no. 1, s. 275-282. ISSN 0950-382X.
45. CACERES, N.E.; HARRIS, N.B.; WELLEHAN, J.F. et al. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*. 1997, vol. 179, no. 16, s. 5046-5055. ISSN 0021-9193.
46. FENG, Z.Y.; BARLETTA, R.G. Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine : D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003, vol. 47, no. 1, s. 283-291. ISSN 0066-4804.
47. GINSBERG, A. Drugs in Development for Tuberculosis. *Drugs*. 2010, vol. 70, no. 17, s. 2201-2214. ISSN 0012-6667.
48. GINSBURG, A.S.; GROSSET, J.H.; BISHAI, W.R. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet infectious diseases*. 2003, vol. 3, no. 7, s. 432-442. ISSN 1473-3099.
49. NUERMBERGER, E.L.; YOSHIMATSU, T.; TYAGI, S. et al. Moxifloxacin-containing regimen greatly reduces time to culture conversion in murine tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003, vol. 169, no. 3, s. 421-426. ISSN 1073-449X.
50. HU, Y.M.; COATES, A.R.M.; MITCHISON, D.A. Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003, vol. 47, no. 2, s. 653-657. ISSN 0066-4804.
51. RUSTOMJEE, R.; LIENHARDT, C.; KANYOK, T. et al. A Phase II study of the sterilising activities of ofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2008, vol. 12, no. 2, s. 128-138. ISSN 1027-3719.
52. DISRATTHAKIT, A.; DOI, N. In vitro activities of DC-159a, a novel fluoroquinolone, against *Mycobacterium* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010, vol. 54, no. 6, s. 2684-2686. ISSN 0066-4804.
53. SHINABARGER, D.L.; MAROTTI, K.R.; MURRAY, R.W. et al. Mechanism of action of oxazolidinones : Effects of linezolid and eperzolid on translation reactions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997, vol. 41, no. 10, s. 2132-2136. ISSN 0066-4804.
54. SWANEY, S.M.; AOKI, H.; GANOZA, M.C. et al. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998, vol. 42, no. 12, s. 3251-3255. ISSN 0066-4804.
55. WILSON, A.P.R.; CEPEDA, J.; HAYMAN, S. et al. In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens to linezolid and teicoplanin and effect on outcome in critically ill patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006, vol. 58, no. 2, s. 470-473. ISSN 0305-7453.
56. FORTUN, J.; MARTIN-DAVILA, P.; NAVAS, E. et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005, vol. 56, no. 1, s. 180-185. ISSN 0305-7453.

57. VON DER LIPPE, B.; SANDVEN, P.; BRUBAKK, O. Efficacy and safety of linezolid in multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) - a report of ten cases. *The Journal of infection*. 2006, vol. 52, no. 2, s. 92-96. ISSN 0163-4453.
58. BARBACHYN, M.R.; HUTCHINSON, D.K.; BRICKNER, S.J. et al. Identification of a novel oxazolidinone (U-100480) with potent antimycobacterial activity. *Journal of medicinal chemistry*. 1996, vol. 39, no. 3, s. 680-685. ISSN 0022-2623.
59. *Newtbdugs.org* [online]. 12-Sep-2011 [cit. 2011-10-28]. WGND. Dostupné z WWW: <<http://www.newtbdugs.org/project.php?id=135>>.
60. WILLIAMS, K.N.; STOVER, C.K.; ZHU, T. et al. Promising Antituberculosis Activity of the Oxazolidinone PNU-100480 Relative to That of Linezolid in a Murine Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009, vol. 53, no. 4, s. 1314-1319. ISSN 0066-4804.
61. RIVERS, E.; MANCERA, R.L. New anti-tuberculosis drugs with novel mechanisms of action. *Current medicinal chemistry*. 2008, vol. 15, no. 19, s. 1956-1967. ISSN 0929-8673.
62. ANDRIES, K.; VERHASSELT, P.; GUILLEMONT, J. et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2005, vol. 307, no. 5707, s. 223-227. ISSN 0036-8075.
63. KOUL, A.; DENDOUGA, N.; VERGAUWEN, K. et al. Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nature chemical biology*. 2007, vol. 3, no. 6, s. 323-324. ISSN 1552-4450.
64. LENAERTS, A.J.; HOFF, D.; ALY, S. et al. Location of persisting mycobacteria in a guinea pig model of tuberculosis revealed by R207910. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 9, s. 3338-3345. ISSN 0066-4804.
65. HUITRIC, E.; VERHASSELT, P.; ANDRIES, K. et al. In vitro antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 11, s. 4202-4204. ISSN 0066-4804.
66. LEE, R.E.; PROTOPOPOVA, M.; CROOKS, E. et al. Combinatorial lead optimization of [1,2]-diamines based on ethambutol as potential antituberculosis preclinical candidates. *Journal of combinatorial chemistry*. 2003, vol. 5, no. 2, s. 172-187. ISSN 1520-4766.
67. PROTOPOPOVA, M.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005, vol. 56, no. 5, s. 968-974. ISSN 0305-7453.
68. JIA, L.; NOKER, P.E.; COWARD, L. et al. Interspecies pharmacokinetics and in vitro metabolism of SQ109. *British Journal of Pharmacology*. 2006, vol. 147, no. 5, s. 476-485. ISSN 0007-1188.
69. HORWITH G.; EINCK, L.; PROTOPOPOVA, M. et al. Phase 1 safety and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine antituberculosis drug [abstract]. 45th IDSA Annual Meeting; 2007 Oct 4-7; San Diego (CA).
70. ONAJOLE, O.K.; GOVENDER, P.; VAN HEIDEN, P.D. et al. Synthesis and evaluation of SQ109 analogues as potential anti-tuberculosis candidates. *European journal of medicinal chemistry*. 2010, vol. 45, no. 5, s. 2075-2079. ISSN 0223-5234.
71. NAGARAJAN, K.; SHANKAR, R.G.; RAJAPPA, S. et al. Nitroimidazoles .21. 2,3-dihydro-6-nitroimidazo[2,1-b]oxazoles with antitubercular activity. *European journal of medicinal chemistry*. 1989, vol. 24, no. 6, s. 631-633. ISSN 0223-5234.

72. STOVER, C.K.; WARRENER, P.; VANDEVANTER, D.R. et al. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*. 2000, vol. 405, no. 6789, s. 962-966. ISSN 0028-0836.
73. TYAGI, S.; NUERMBERGER, E.; YOSHIMATSU, T. et al. Bactericidal activity of the nitroimidazopyran PA-824 in a murine model of tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005, vol. 49, no. 6, s. 2289-2293. ISSN 0066-4804.
74. BARRY, C.E.; BOSHOFF, H.I.M.; DOWD, C.S. Prospects for clinical introduction of nitroimidazole antibiotics for the treatment of tuberculosis. *Current pharmaceutical design*. 2004, vol. 10, no. 26, s. 3239-3262. ISSN 1381-6128.
75. MANJUNATHA, U.H.; BOSHOFF, H.; DOWD, C.S. et al. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, vol. 103, no. 2, s. 431-436. ISSN 0027-8424.
76. SASAKI, H.; HARAGUCHI, Y.; ITOTANI, M. et al. Synthesis and antituberculosis activity of a novel series of optically active 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazoles. *Journal of medicinal chemistry*. 2006, vol. 49, no. 26, s. 7854-7860. ISSN 0022-2623.
77. MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T. et al. OPC-67683, a nitro-dihydroimidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Medicine*. 2006, vol. 3, no. 11, s. 2131-2144. ISSN 1549-1277.
78. SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H.I.M. et al. PA-824 Kills Nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis* by Intracellular NO Release. *Science*. 2008, vol. 322, no. 5906, s. 1392-1395. ISSN 0036-8075.
79. DEIDDA, D.; LAMPIS, G.; FIORAVANTI, R. et al. Bactericidal activities of the pyrrole derivative BM212 against multidrug-resistant and intramacrophagic *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998, vol. 42, no. 11, s. 3035-3037. ISSN 0066-4804.
80. BIAVA, M. BM 212 and its derivatives as a new class of antimycobacterial active agents. *Current medicinal chemistry*. 2002, vol. 9, no. 21, s. 1859-1869. ISSN 0929-8673.
81. ARORA, S.K.; SINHA, N.; SINHA, R.K. et al. Synthesis and in vitro anti-mycobacterial activity of a novel anti-TB composition LL4858 [abstract no. F-1115]. American Society for Microbiology: program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2004: 212.
82. SOLOMONS, I.A.; SPOERRI, P.E. Esters of pyrazinoic and pyrazine-2,3-dicarboxylic acids. *Journal of the American Chemical Society*. 1953, vol. 75, no. 3, s. 679-681. ISSN 0002-7863.
83. MERCK AG E. *Verfahren zur Herstellung von Abkoemmlingen der Pyrazinmonocarbonsaeure*. DALMER, O.; WALTER, E.. DE632257 (C). 1936-07-04.
84. MALONE, L. The effect of pyrazinamide (aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *The American review of tuberculosis*. 1952, vol. 65, no. 5, s. 511-518. ISSN 0096-0381.
85. SOLOTOROVSKY, M. Pyrazinoic acid amide - an agent active against experimental murine tuberculosis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1952, vol. 79, no. 4, s. 563-565. ISSN 0037-9727.

86. MCKENZIE, D. The effect of nicotinic acid amide on experimental tuberculosis of white mice. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1948, vol. 33, no. 10, s. 1249-1253. ISSN 0022-2143.
87. KONNO, K.; FELDMANN, F.M.; MCDERMOT, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *The American review of respiratory disease*. 1967, vol. 95, no. 3, s. 461-469. ISSN 0003-0805.
88. ZHANG, Y; WADE, M. M; SCORPIO, A. et al. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003, vol. 52, no. 5, s. s. 790-795. ISSN 0305-7453
89. ZHANG, Y; SCORPIO, A; NIKAIDO, H. et al. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of bacteriology*. 1999, vol. 181, no. 7, s. 2044-2049. ISSN 0021-9193.
90. ZHANG, Y; ZHANG, Y; SUN, Z. Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to weak acids. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003, vol. 52, no. 1, s. 56-60. ISSN 0305-7453.
91. WADE, M.M.; ZHANG, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis in vitro. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006, vol. 58, no. 5, s. 936-941. ISSN 0305-7453.
92. SCORPIO, A.; LINDHOLM-LEVY, P.; HEIFETS, L. et al. Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997, vol. 41, no. 3, s. 540-543. ISSN 0066-4804.
93. MORLOCK, G.P.; CRAWFORD, J.T.; BUTLER, W.R. et al. Phenotypic characterization of pncA mutants of Mycobacterium tuberculosis.. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000, vol. 44, no. 9, s. 2291-2295. ISSN 0066-4804.
94. BOSHOFF, H.I.M.; XU, X.; TAHLAN, K. et al. Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in Mycobacterium tuberculosis - An essential role for NAD in nonreplicating bacilli. *Journal of biological chemistry*. 2008, vol. 283, no. 28, s. 19329-19341. ISSN 0021-9258.
95. ZIMHONY, O.; COX, J.S.; WELCH, J.T. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nature medicine*. 2000, vol. 6, no. 9, s. 1043-1047. ISSN 1078-8956.
96. BOSHOFF, H.I.; MIZRAHI, V.; BARRY, C.E. Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of bacteriology*. 2002, vol. 184, no. 8, s. 2167-2172. ISSN 0021-9193.
97. ZIMHONY, O.; VILCHEZE, C.; ARAI, M. et al. Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 2, s. 752-754. ISSN 0066-4804.
98. NGO, S.; ZIMHONY, O.; CHUNG, W.J. et al. Inhibition of isolated mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007, vol. 51, no. 7, s. 2430-2435. ISSN 0066-4804.
99. SAYAHI, H.; ZIMHONY, O.; JACOBS, W.R.Jr. et al. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 2011, vol. 21, no. 16, s. 4804-4807. ISSN 0960-894X.

100. MOORE, S.D.; SAUER, R.T. The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annual review of biochemistry*. 2007, vol. 76, no. 1, s. 101-124. ISSN 0066-4154.
101. WITHEY, J.H.; FRIEDMAN, D.I. A salvage pathway for protein synthesis : tmRNA and trans-translation. *Annual review of microbiology*. 2003, vol. 57, no. 1, s. 101-123. ISSN 0066-4227.
102. MUTO, A.; USHIDA, C.; HIMENO, H. et al. A bacterial RNA that functions as both a tRNA and an mRNA. *Trends in biochemical sciences*. 1998, vol. 23, no. 1, s. 25-29. ISSN 0968-0004.
103. SHI, W.; ZHANG, X.; JIANG, X. et al. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 2011, vol. 333, no. 6049, s. 1630-1632. ISSN 0036-8075.
104. PELOQUIN, C.A.; BULPITT, A.E.; JARESKO, G.S. et al. Pharmacokinetics of pyrazinamide under fasting conditions, with food, and with antacids. *Pharmacotherapy*. 1998, vol. 18, no. 6, s. 1205-1211. ISSN 0277-0008.
105. ZHU, M.; STARKE, J.R.; BURMAN, W.J. et al. Population pharmacokinetic modeling of pyrazinamide in children and adults with tuberculosis. *Pharmacotherapy*. 2002, vol. 22, no. 6, s. 686-695. ISSN 0277-0008.
106. LACROIX, C.; HOANG, T.P.; NOUVEAU, J. et al. Pharmacokinetics of pyrazinamide and its metabolites in healthy subjects. *European journal of clinical pharmacology*. 1989, vol. 36, no. 4, s. 395-400. ISSN 0031-6970.
107. LACROIX, C.; GUYONNAUD, C.; CHAOU, M. et al. Interaction between allopurinol and pyrazinamide. *The European respiratory journal*. 1988, vol. 1, no. 9, s. 807-811. ISSN 0903-1936.
108. CULLEN, J.H.; EARLY, L.J.A.; FIORE, J.M. Occurance of hyperuricemia during pyrazinamide-isoniazid therapy. *American review of tuberculosis and pulmonary diseases*. 1956, vol. 74, no. 2, s. 289-292. ISSN 0096-039X.
109. JENNER, P.J.; ELLARD, G.A.; ALLAN, W.G.L. et al. Serum uric-acid concentrations and arthralgia among patitents treated with pyrazinamide-containing regimens in Hong-Kong and Singapore. *Tubercle*. 1981, vol. 62, no. 3, s. 175-179. ISSN 0041-3879.
110. QURESHI, W.; HASSAN, G.; KADRI, S.M. et al. Hyperuricemia and arthralgias during pyrazinamide therapy in patients with pulmonary tuberculosis. *Laboratory medicine*. 2007, vol. 38, no. 8, s. 495-497. ISSN 0007-5027.
111. *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development : Volume 7: Antiinfectives*. Edited by Donald J. Abraham, David P. Rotella. 7th ed. [s.l.] : WILEY, 2010. Lower Respiratory System Infections, s. 755-759. ISBN 978-0-470-77008-5.
112. YEW, W.W.; LEUNG, C.C. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity. *Respirology*. 2006, vol. 11, no. 6, s. 699-707. ISSN 1323-7799.
113. CHANG, K.C.; LEUNG, C.C.; YEW, W.W. et al. Hepatotoxicity of pyrazinamide - Cohort and case-control analyses. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008, vol. 177, no. 12, s. 1391-1396. ISSN 1073-449X.
114. TOSTMANN, A.; BOEREE, M.J.; PETERS, W.H.M. et al. Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce in vitro pyrazinamide toxicity. *International journal of antimicrobial agents*. 2008, vol. 31, no. 6, s. 577-580. ISSN 0924-8579.

- 115.** ROGERS, E.F.; LEANZA, W.J.; BECKER, H.J. et al. Antitubercular Diazine Carboxamides. *Science*. 1952, vol. 116, no. 3010, s. 253-254. ISSN 0036-8075.
- 116.** KUSHNER, S.; DALALIAN, H.; SANJURJO, J.L. et al. Experimental chemotherapy of tuberculosis .2. The synthesis of pyrazinamides and related compounds. *Journal of the American Chemical Society*. 1952, vol. 74, no. 14, s. 3617-3621. ISSN 0002-7863.
- 117.** WACHTER, G.A.; DAVIS, M.C.; MARTIN, A.R. et al. Antimycobacterial activity of substituted isosteres of pyridine- and pyrazinecarboxylic acids. *Journal of medicinal chemistry*. 1998, vol. 41, no. 13, s. 2436-2438. ISSN 0022-2623.
- 118.** VONTOR, T.; PALAT, K.; ODLEROVÁ, Z. Antituberculostatics. XXXIV. Functional derivatives of 6-methyl-2-pyrazinecarboxylic acid. *Česko-Slovenská Farmacie*. 1985, vol. 34, no. 10, s. 441-442.
- 119.** CYNAMON, M.H.; SPEIRS, R.J.; WELCH, J.T. In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998, vol. 42, no. 2, s. 462-463. ISSN 0066-4804.
- 120.** CYNAMON, M.H.; CYNAMON, S.P.; CHOU, T.S. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid-esters. *Journal of medicinal chemistry*. 1992, vol. 35, no. 7, s. 1212-1215. ISSN 0022-2623.
- 121.** CYNAMON, M.H.; GIMI, R.; GYENES, F. et al. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. *Journal of medicinal chemistry*. 1995, vol. 38, no. 20, s. 3902-3907. ISSN 0022-2623.
- 122.** SPEIRS, R.J.; WELCH, J.T.; CYNAMON, M.H. Activity of n-propyl pyrazinoate against pyrazinamide-resistant mycobacterium-tuberculosis - investigations into mechanism of action of and mechanism of resistance to pyrazinamide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995, vol. 39, no. 6, s. 1269-1271. ISSN 0066-4804.
- 123.** LI, B.; SEDLACEK, M.; MANOHARAN, I. et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical pharmacology*. 2005, vol. 70, no. 11, s. 1673-1684. ISSN 0006-2952.
- 124.** BERGMANN, K.E.; CYNAMON, M.H.; WELCH, J.T. Quantitative structure-activity relationships for the in vitro antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters. *Journal of medicinal chemistry*. 1996, vol. 39, no. 17, s. 3394-3400. ISSN 0022-2623.
- 125.** SIMOES, M.F.; VALENTE, E.; RODRIGUEZ-GOMEZ, M.J. et al. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs Stability, activation and activity against M. tuberculosis. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2009, vol. 37, no. 3-4, s. 257-263. ISSN 0928-0987.
- 126.** DOLEZAL, M.; VICIK, R.; MILETIN, M. et al. Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chemické zvesti*. 2000, vol. 54, no. 4, s. 245-248. ISSN 0366-6352.
- 127.** DOLEZAL, M.; HARTL, J.; MILETIN, M. Antimycobacterial evaluation of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acid. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*. 2000, vol. 25, s. 15-19. ISSN 1210-9495.
- 128.** DOLEZAL, M.; MILETIN, M.; KUNES, J. et al. Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids : Synthesis and biological activity. *Molecules*. 2002, vol. 7, no. 3, s. 363-373. ISSN 1420-3049.
- 129.** DOLEZAL, M.; PALEK, L.; VINSOVA, J. et al. Substituted pyrazinecarboxamides : synthesis and biological evaluation. *Molecules*. 2006, vol. 11, no. 4, s. 242-256. ISSN 1420-3049.

- 130.** DOLEZAL, M.; CMEDLOVA, P.; PALEK, L. et al. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European journal of medicinal chemistry*. 2008, vol. 43, no. 5, s. 1105-1113. ISSN 0223-5234.
- 131.** HEIFETS, L.; HIGGINS, M.; SIMON, B. Pyrazinamide is not active against Mycobacterium tuberculosis residing in cultured human monocyte-derived macrophages. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2000, vol. 4, no. 6, s. 491-495. ISSN 1027-3719.
- 132.** TEYSSIER, L. Higher activity of morphazinamide over pyrazinamide against intracellular. *The international journal of tuberculosis and lung disease*. 2001, vol. 5, no. 4, s. 386. ISSN 1027-3719.
- 133.** TRNKA, L.; KUSKA, J.; HAVEL, A. Comparison of the antituberculous activity of morphazinamide and pyrazinamide on chronic experimental tuberculosis. I. The antimycobacterial efficacy made *in vitro* and *in vivo*. *Chemotherapy*. 1964, vol. 9, no. 3, s. 158. ISSN 0009-3157.
- 134.** CHUNG, W.J.; KORNILOV, A.; BRODSKY, B.H. et al. Inhibition of M. tuberculosis in vitro in monocytes and in mice by aminomethylene pyrazinamide analogs. *Tuberculosis*. 2008, vol. 88, no. 5, s. 410-419. ISSN 1472-9792.
- 135.** RES FOUNDATION STATE UNIVERSIT [US]. *Aminomethylene amide analogs of pyrazinamide with intracellular antimycobacterial activity against pyrazinamide-resistant mycobacteria combined with a rifamycin*. WELCH JOHN T [US]; HEIFETS LEONID B [US]; CYNAMON MICHAEL H [US]. US 6399607 (B1). 2002-06-04. Dostupné volně z WWW: <
http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20020604&DB=EPODOC&local_e=en_EP&CC=US&NR=6399607B1&KC=B1>. (IPC1-7): A61K31/495; A61K31/50; A61K31/70.
- 136.** SRIRAM, D.; YOGESWARI, P.; REDDY, S.P. Synthesis of pyrazinamide Mannich bases and its antitubercular properties. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 2006, vol. 16, no. 8, s. 2113-2116. ISSN 0960-894X.
- 137.** CARTA, A.; CORONA, P.; LORIGA, M. Quinoxaline 1,4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities. *Current medicinal chemistry*. 2005, vol. 12, no. 19, s. 2259-2272. ISSN 0929-8673.
- 138.** ZARRANZ, B.; JASO, A.; ALDANA, I. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2003, vol. 11, no. 10, s. 2149-2156. ISSN 0968-0896.
- 139.** MORENO, E.; ANCIZU, S.; PEREZ-SILANES, S. et al. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives.. *European journal of medicinal chemistry*. 2010, vol. 45, no. 10, s. 4418-4426. ISSN 0223-5234.
- 140.** IMRAMOVSKY, A.; POLANC, S.; VINSOVA, J. et al. A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2007, vol. 15, no. 7, s. 2551-2559. ISSN 0968-0896.
- 141.** DLABAL, K.; PALAT, K.; LYCKA, A. et al. Synthesis and H-1 and C-13 NMR-spectra of sulfur derivatives of pyrazine derived from amidation product of 2-chloropyrazine and 6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile - tuberculostatic activity. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1990, vol. 55, no. 10, s. 2493-2501. ISSN 0010-0765.
- 142.** JAMPILEK, J.; DOLEŽAL, M.; KUNEŠ, J. et al. Novel regioselective preparation of 5-chloropyrazine-2-carbonitrile from pyrazine-2-carboxamide and coupling study of substituted phenylsulfanylpiprazine-2-carboxylic acid derivatives. *Current organic chemistry*. 2005, vol. 9, no. 1, s. 49-60. ISSN 1385-2728.

- 143.** PALEK, L.; DVORAK, J.; SVOBODOVA, M. et al. Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of 3-arylamino-pyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie*. 2008, vol. 341, no. 1, s. 61-65. ISSN 0365-6233.
- 144.** DLABAL, Karel. *Příprava funkčních derivátů na jádře substituované kyseliny 2-pyrazinmonokarboxylové jako potenciálních antituberkulotik*. Hradec Králové, 1989. Kandidátská disertační práce (CSc.). Karlova univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 145.** DOLEŽAL, Martin. *Deriváty na jádře substituovaných pyrazinkarboxylových kyselin jako potenciální antituberkulotika a antimykotika*. Hradec Králové, 1996. Doktorská disertační práce (Ph.D.). Karlova univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 146.** JAMPÍLEK, Josef. *Analoga chinlukastu jako potenciální antileukotrienika*. Hradec Králové, 2004. Disertační práce (Ph.D.). Karlova univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2004-04-20.
- 147.** PALEK, Lukáš. *Deriváty pyrazinamidu jako potenciální antituberkulotika*. Hradec Králové, 2009. Disertační práce (Ph.D.). Karlova univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009-04-15.
- 148.** *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility* [online]. c2004 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.taacf.org/>>.
- 149.** *TAACF: Contact Information* [online]. c2004 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://taacf.org/downloads.htm>>.
- 150.** *CNCTC - Česká národní sbírka typových kultur* [online]. 25. červen, 2008 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.szu.cz/cnctc/>>.
- 151.** 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.
- 152.** JONES, R.N.; BARRY, A.L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for mic interpretation, and quality-control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *Journal of clinical microbiology*. 1987, vol. 25, no. 10, s. 1920-1925. ISSN 0095-1137.
- 153.** *CCM Czech Collection of Microorganisms* [online]. 19. 10. 2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/ccm/>>.
- 154.** DELAND, F.H.; WAGNER, H.N. Early detection of bacterial growth with carbon-14-labeled glucose. *Radiology*. 1969, vol. 92, no. 1, s. 154-155. ISSN 0033-8419.
- 155.** CUMMINGS, D.M.; RISTROPH, D.; CAMARGO, E.E. Radiometric detection of metabolic-activity of mycobacterium-tuberculosis. *The Journal of Nuclear Medicine*. 1975, vol. 16, no. 12, s. 1189-1191. ISSN 0161-5505.
- 156.** MIDDLEBROOK, G.; REGGIARDO, Z.; TIGERTT, W.D. Automatable radiometric detection of growth of mycobacterium-tuberculosis in selective media. *The American review of respiratory disease*. 1977, vol. 115, no. 6, s. 1066-1069. ISSN 0003-0805.
- 157.** SIDDIQI, S.H.; LIBONATI, J.P.; MIDDLEBROOK, G. Evaluation of a rapid radiometric method for drug susceptibility testing of mycobacterium-tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 1981, vol. 13, no. 5, s. 908-912. ISSN 0095-1137.

158. *BD BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System* [online]. c2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://catalog.bd.com/bdCat/viewProduct.doCustomer?productNumber=445870>>.
159. PREININGER, C.; KLIMANT, I.; WOLFBEIS, O.S. Optical-fiber sensor for biological oxygen-demand. *Analytical chemistry*. 1994, vol. 66, no. 11, s. 1841-1846. ISSN 0003-2700.
160. PAGE, B.; PAGE, M.; NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *International journal of oncology*. 1993, vol. 3, no. 3, s. 473-476. ISSN 1019-6439.
161. NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of immunological methods*. 1997, vol. 204, no. 2, s. 205-208. ISSN 0022-1759.
162. FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; MCLAUGHLIN, J.C. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of clinical microbiology*. 1998, vol. 36, no. 2, s. 362-366. ISSN 0095-1137.
163. COLLINS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997, vol. 41, no. 5, s. 1004-1009. ISSN 0066-4804.
164. DOLEZAL, M.; HARTL, J.; MACHACEK, M. Preparation of some n-substituted 3-amino-5-cyano-2-pyrazinecarboxamides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1994, vol. 59, no. 11, s. 2562-2564. ISSN 0010-0765.
165. TOPLISS, J.G.; COSTELLO, R.J. Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression-analysis. *Journal of medicinal chemistry*. 1972, vol. 15, no. 10, s. 1066-1068. ISSN 0022-2623.
166. DOLEZAL, M.; HARTL, J.; LYCKA, A. et al. Synthesis and antituberculous activity of some substituted 3-arylamino-5-cyano-2-pyrazinecarboxamides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1995, vol. 60, no. 7, s. 1236-1241. ISSN 0010-0765.

11 Seznam příloh

- P1** DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; KEŠETOVIČOVÁ, D.; KUNEŠ, J.; SVOBODOVÁ, M. Substituted *N*-Phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. *Molecules*. 2009; vol. 14, no. 10, s. 4180–4189. [ISSN 1420-3049] DOI:10.3390/molecules14104180. IF₂₀₀₉ = 1.738.
- P2** DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; OSIČKA, Z.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; VEJSOVÁ, M.; DOHNAL, J.; JAMPÍLEK, J.; KRÁĀOVÁ, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, 2010, vol. 15, no. 12, s. 8567–8581. IF₂₀₁₀ = 1.988 [ISSN 1420-3049], DOI:10.3390/molecules15128567. IF₂₀₀₉ = 1.738.
- P3** ZITKO, J.; DOLEŽAL, M.; SVOBODOVÁ, M.; VEJSOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; KUČERA, R.; JÍLEK, P. Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, vol. 19, no. 4, s. 1471–1476. [ISSN 0968-0896], DOI:10.1016/j.bmc.2010.12.054. IF₂₀₁₀ = 2.978.
- P4** ZITKO, J.; JAMPÍLEK, J.; DOROVOLNÝ, L.; SVOBODOVÁ, M.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. Zasláno k posouzení do *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
- P5** ZITKO, J. Příprava a biologická aktivita 3-(benzylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamidů a 3-(benzylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitrilů. Nепublikovaná data. 2011.
- P6** DOLEŽAL, M.; KEŠETOVIČ, D.; ZITKO, J. Antimycobacterial evaluation of pyrazinecarboxylic acid derivatives. *Curr. Pharm. Design*, 2011, vol. 17, s. 3506-3514. [ISSN 1381-6128]. IF₂₀₁₀ = 4.774.