

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. Barbora Vaňásková

Vedoucí disertační práce:
Odborný konzultant:

Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Hradec Králové, září 2016

Prohlašuji, že tato práce je mým původním dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové, září 2016

.....
Mgr. Barbora Vaňásková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především mému školiteli prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a odbornému konzultantovi PharmDr. Janu Zitkovi, Ph.D., za odborné vedení a přátelský přístup v průběhu celého mého doktorského studia, za cenné rady a pomoc při přípravě této disertační práce.

Rovněž děkuji svým kolegům z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, kteří mi pomáhali při tvorbě publikací a s řešením dílčích výzkumných úkolů. Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Csc. za změření a interpretaci NMR spekter, Ing. Vladimíru Kubíčkoví, CSc. za pomoc při měření lipofility některých látek, doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za změření a interpretaci hmotnostních spekter některých látek a také PharmDr. Vladimíru Garajovi, PhD. za provedení a vyhodnocení dockingových studií.

Dále bych ráda poděkovala osobám podílejícím se na biologickém testování a to doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc., MUDr. Pavle Paterové a Silvě Čermákové z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové za provedení testování antimykobakteriální aktivity, prof. Lieve Naesens z Rega institutu Katolické univerzity v Lovani za hodnocení antivirové aktivity, paní Idě Dufková za testování antibakteriální a antifungální aktivity a PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za možnost využívání vybavení na Katedře biologických a lékařských věd. Děkuji též doc. RNDr. Janě Kordulákové, PhD. a doc. RNDr. Kataríně Mikušové, DrSc. z Katedry biochemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě za pomoc a cenné rady při studiu inhibice syntézy mykolátů.

V neposlední řadě pak velmi děkuji mému manželovi, rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory následujících grantů a projektů:

- Grant GAUK 710312 B-CH/FaF
- Grant GAUK 1594214 B-CH/FaF
- Grant SVV-2016-260-291,
- Grant IGA NZ 13346,
- Projekt FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194,
- Projekt TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235,
- Projekt Pre-seed II CZ.1.05/3.1.00/14.0299.

Seznam použitých zkratek

ACP	Acyl Carrier Protein
AG	arabinogalaktan
AMB	amfotericin B
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
ATP	adenosintrifosfát
Bac	bacitracin
CFU	Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)
Cip	ciprofloxacín
CoA	koenzym A
CrFK	Crandell-Rees Feline Kidney (buněčná linie izolovaná z kočičích ledvin)
Cys	cystein
Ddn	deazaflavin-dependentní nitroreduktasa
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOTS	Directly Observed Treatment Short-Course (systém terapie tuberkulózy založený na přímém dohledu na probíhající léčbu a užívání léků)
dpm	Disintegrations per minute (počet rozpadů radionuklidu za minutu)
FAME	Fatty Acid Methyl Esters (methylestery mastných kyselin)
FAS I	Fatty Acid Synthase I (synthasa mastných kyselin I)
FAS II	Fatty Acid Synthase II (synthasa mastných kyselin II)
FLU	flukonazol
Glu	glutamová kyselina
HEL	buněčná linie izolovaná z lidských embryonálních fibroblastů
HeLA	buněčná linie izolovaná z epiteliálních buněk maligního karcinomu děložního čípku
HepG2	buněčná linie izolovaná z lidského hepatoblastomu
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
HSV-1	Herpes Simplex Virus typ 1
HSV-1 KOS	Herpes Simplex Virus typ 1 rezistentní na aciklovir
HSV-2	Herpes Simplex Virus typ 2
INH	isoniazid
InhA	enoyl-ACP reduktasa
KatG	katalasa-peroxidasa
LAM	lipoarabinomanan

LD ₅₀	letální dávka, tj. dávka látky, která je smrtelná pro 50% testovaných organismů
LM	lipomanan
Lys	lysin
MA	Mycolic Acids (mykolové kyseliny)
MABA	Microplate Alamar Blue Assay (metodika testování antimykobakteriální aktivity)
mAGP	mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex
MAME	Mycolic Acid Methyl Esters (methylestery mykolových kyselin)
MDR-TB	Multidrug Resistant Tuberculosis (lékově multirezistentní tuberkulóza)
MHA	Müller-Hintonův agar
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MmpL3	Mycobacterial Membrane Protein, Large 3 (membránový transportér pro TMM)
MOM	Mycobacterial Outer Membrane (vnější mykobakteriální membrána)
MraY	translokasa I
MRSA	meticilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukováná forma)
NAMN	mononukleotid kyseliny nikotinové
Neom	neomycin-sulfát
QAPRT _{asa}	fosforibosyl transferasa kyseliny chinolinové
PE	fosfatidylethanolamin
Pen	penicilin G
PG	peptidoglykan
Phe	fenylalanin
PI	fosfatidylinositol
PIM	fosfatidylinositol manosidy
PncA	nikotinamidasa/pyrazinamidasa
POA	pyrazinkarboxylová kyselina
POE	ester kyseliny pyrazinkarboxylové
PZA	pyrazinamid
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	mediátorové ribonukleová kyselina
RpsA	ribosomální protein S1
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RSV	respirační syncytiální virus

SAR	Structure-Activity Relationships (vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou)
TAG	triacylglycerol
TCL	triklosan
TDM	trehalóza dimykolát
TEA	triethylamin
TLC	Thin Layer Chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TMM	trehalóza monomykolát
tmRNA	transferová-mediátorová ribonukleová kyselina
tmRNP	komplex tvořený tmRNA, malým proteinem SmpB, elongačním faktorem Tu a RpsA
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky
Vero	buněčná linie izolovaná z opičích ledvin
VSV	virus vezikulární stomatitidy
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
XDR-TB	Extensively Drug Resistant Tuberculosis (lékově extenzivně rezistentní tuberkulóza)

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
Kandidát: Mgr. Barbora Vaňásková
Školitel: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Název disertační práce: Deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika (příprava a studium biologických vlastností)

Disertační práce se zabývá hledáním potenciálních antituberkulotik odvozených od pyrazinkarboxylové kyseliny. Součástí práce je teoretická část, ve které je nastíněna problematika tuberkulózy, faktory ztěžující efektivní léčbu onemocnění (vývoj rezistence a koinfekce HIV) a současné terapeutické postupy. Samostatná kapitola je věnována složení mykobakteriální buněčné stěny. Dále je uveden stručný přehled používaných antituberkulotik první a druhé linie, léčiv nově zavedených do klinické praxe a slibných derivátů v různých fázích preklinického a klinického hodnocení. Zvláštní pozornost je věnována pyrazinamidu, přehledu současných teorií mechanismu účinku tohoto antituberkulotika první linie a specifickému cíli pyrazinkarboxylové kyseliny, tj. ribosomálnímu proteinu S1. Pro úplnost je uveden přehled derivátů pyrazinamidu s antimykobakteriální aktivitou publikovaných od roku 2011 (mimo sloučeniny publikované pracovní skupinou prof. Doležala).

Vlastní praktická část se zabývá přípravou a hodnocením biologické aktivity derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny. Konkrétně bylo připraveno 123 derivátů (z toho 111 autorkou disertační práce). V rámci první části se jednalo o *N*-benzyl či *N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (53 látek). Zbývajících 70 sloučenin patřilo k alkylamino, fenylalkylamino a cykloalkylamino derivátům pyrazinamidu, *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu, *N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzyl-pyrazin-2-karboxamidu. Převážně se jednalo o polohové isomery 5 a 6, v případě alkylamino derivátů *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu i 3-isomery. Všechny připravené látky byly testovány *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a třem kmenům atypických mykobakterií – *M. kansasii* a dvěma kmenům *M. avium*. Ve všech připravených sériích byly pozorovány látky s vynikající *in vitro* aktivitou vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC = 1,56 – 3,13 µg/ml, tj. 5 – 10 µmol/l) srovnatelnou s INH (MIC = 0,2 – 1,56 µg/ml, tj. 1,5 – 11 µmol/l) či výrazně převyšující aktivitu PZA (MIC = 6,25 – 12,5 µg/ml, tj. 51 – 102 µmol/l). Část látek též vykazovala aktivitu vůči atypickým mykobakteriím. Na základě získaných dat byly studovány vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou.

U všech látek byla dále testována antibakteriální a antifungální aktivita, u části látek pak aktivita herbicidní či antivirová. Pouze látky ze skupiny cykloalkylamino derivátů vykazaly aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím srovnatelnou s použitými standardy. Žádná z látek nevykazala antifungální aktivitu či aktivitu vůči testovaným Gram-negativním bakteriálním kmenům. Až na několik výjimek nebyla pozorována významná antivirová a herbicidní aktivita.

Některé sloučeniny byly dále studovány z hlediska vlivu na syntézu esenciálních složek mykobakteriální buněčné stěny, tj. jako potenciální inhibitory syntasy mastných kyselin I či enoyl-ACP reductázy. Tento mechanismus účinku nicméně nebyl prokázán.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy v Hradci Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Barbora Vaňásková

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

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

This doctoral thesis deals with searching for potential antituberculotic drugs derived from pyrazinecarboxylic acid. Thesis contains theoretical part, in which problematics of tuberculosis, factors hindering the effectiveness of treatment (development of resistance and HIV coinfection) and current therapeutic practice are outlined. An individual chapter is devoted to the composition of the mycobacterial cell wall. A brief overview of first-line and second-line antituberculars as well as drugs newly introduced into the clinical practice and promising derivatives in various phases of preclinical and clinical trials is further stated. Special attention is dedicated to pyrazinamide, current theories dealing with mechanism of action of this first-line antituberculotic drug and to ribosomal protein S1, a specific target of pyrazinecarboxylic acid. A summary of pyrazinamide derivatives with antimycobacterial activity published since 2011 is listed for completeness. Derivatives prepared by working group of professor Doležal were omitted.

The practical part of this thesis describes synthesis and biological evaluation of 123 derivatives (111 synthesised by author of the thesis) of pyrazinecarboxylic acid. First series includes 53 derivatives of *N*-benzyl or *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. Remaining 70 compounds belong mainly to 5- or 6-alkylamino, phenylalkylamino and cycloalkylamino derivatives of pyrazinamide, *N*-phenylpyrazine-2-carboxamide, *N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide and *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide. In the case of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides, the 3-alkylamino isomers were prepared as well. All prepared compounds were screened for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and atypical mycobacteria – *M. kansasii* and two strains of *M. avium*. Compounds with excellent *in vitro* activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv were reported in all prepared series. The activity of these derivatives (MIC = 1,56 – 3,13 µg/ml, i.e. 5 – 10 µmol/l) was comparable to INH (MIC = 0,2 – 1,56 µg/ml, i.e. 1,5 – 11 µmol/l) or significantly exceeding the activity of PZA (MIC = 6,25 – 12,5 µg/ml, i.e. 51 – 102 µmol/l). Few compounds were active against atypical mycobacteria. Main structure-activity relationships are discussed.

All compounds were additionally tested for their antibacterial and antifungal activity. Some of the compounds were tested for herbicidal and antiviral activity as well. Only some

cycloalkylamino derivatives possessed activity against Gram-positive bacteria comparable to used standards. None of the tested compounds exerted antifungal activity or activity against Gram-negative bacteria. With few exceptions, no significant antiviral and herbicidal activity was observed.

The influence of selected compounds on synthesis of essential mycobacterial cell wall components was further evaluated. Nevertheless the proposed mechanism of action – inhibition of fatty acid synthase I or enoyl-ACP reductase was not confirmed.

OBSAH:

1	FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ	13
2	CÍL PRÁCE	14
3	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1	Tuberkulóza	15
3.1.1	Základní fakta	15
3.1.2	Rezistentní formy tuberkulózy	15
3.1.3	Problematika HIV koinfekce	17
3.1.4	Epidemiologie tuberkulózy	18
3.2	Mycobacterium tuberculosis – buněčná stěna	21
3.2.1	Mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex	21
3.2.2	Další složky buněčné stěny	23
3.2.3	Plasmatická membrána	23
3.3	Terapie tuberkulózy	24
3.3.1	Současná farmakoterapie	24
3.3.2	Terapeutické režimy	27
3.3.3	Nová antituberkulotika v klinické praxi	30
3.3.4	Antituberkulotika v preklinických a klinických studiích	32
3.4	Pyrazinamid	38
3.4.1	Mechanismus účinku	38
3.4.2	Mechanismus rezistence na PZA	42
3.4.3	Deriváty pyrazinamidu s antimykobakteriální aktivitou	42
3.4.4	Ribosomální protein S1 - krystalografická struktura a možné obměny pyrazinového jádra	47
4	METODICKÁ ČÁST	49
4.1	Přístroje, chemikálie a použité analytické metody	49
4.2	Použité syntetické postupy	50
4.3	Docking	53
4.4	Metodiky biologického hodnocení	53
4.4.1	Hodnocení antimykobakteriální aktivity	53
4.4.2	Hodnocení antifungální aktivity	55
4.4.3	Hodnocení antibakteriální aktivity	55
4.4.4	Hodnocení inhibice syntézy mykologických kyselin a dalších složek mykobakteriální buněčné stěny	56
4.4.5	Jiné <i>in vitro</i> metody	56
5	KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE	58

5.1	Příprava a biologická aktivita substituovaných <i>N</i>-benzyl a <i>N</i>-fenylpyrazin-2-karboxamidů	58
5.1.1	Přehled připravených látek	58
5.1.2	Syntéza	60
5.1.3	Biologická aktivita	60
5.1.4	SAR	65
5.1.5	Závěr	66
5.2	Příprava a biologická aktivita alkylaminoderivátů pyrazinamidu, <i>N</i>-fenyl a <i>N</i>-benzylpyrazin-2-karboxamidu	67
5.2.1	Přehled připravených látek	67
5.2.2	Syntéza	69
5.2.3	Docking	70
5.2.4	Biologická aktivita	74
5.2.5	Hodnocení vlivu vybraných sloučenin na syntézu mastných a mykolových kyselin a dalších složek mykobakteriální buněčné stěny	81
5.2.6	SAR	85
5.2.7	Závěr	86
6	ZÁVĚR	87
7	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	90
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
9	SEZNAM PŘÍLOH	112

1 FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ

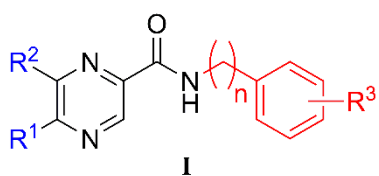
Tuberkulóza společně s HIV a malárií patří k nejčastějším infekčním onemocněním a i v 21. století představuje závažnou hrozbu až pro 1/3 světové populace. Ačkoliv se počty nově infikovaných pacientů během posledních let snižují, bylo v roce 2014 dle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) hlášeno 9,6 milionu nově nakažených a 1,5 milionu pacientů zemřelo na následky tuberkulózy. Z epidemiologického hlediska představuje závažný problém především rozvoj rezistence na běžně používaná antituberkulotika první, ale i druhé linie, a také koinfekce virem HIV. Mezi hlavní příčiny rozvoje rezistence patří především nevhodná léková preskripce, krátká doba léčby, nedostatečná adherence pacienta k léčbě, či v případě rozvojových zemí omezená dostupnost léků. Terapeutický režim u tuberkulózy vyvolané kmenem citlivým na antituberkulotika první linie trvá obvykle 6 měsíců a skládá se z kombinace pyrazinamidu (PZA), isoniazidu, rifampicinu a ethambutolu. V případě komplikovaného průběhu onemocnění nebo tuberkulózy vyvolané rezistentními kmeny se podává kombinace pěti a více antituberkulotik (první i druhé linie), což přináší riziko závažných nežádoucích účinků, nedostatečné adherence pacienta k léčbě a rozvoje sekundární rezistence.

PZA patří mezi antituberkulotika první linie a tvoří základní složku terapeutických režimů tuberkulózy. Díky sterilizační aktivitě a synergickému působení s rifampicinem se významnou měrou podílí na zkrácení terapie. Přesný mechanismus účinku PZA nebyl plně objasněn, nicméně se na jeho celkové aktivitě podílí jak nespecifické děje, tak i inhibice v nedávné době rozpoznávaných subcelulárních cílů. PZA je, jakožto proléčivo, metabolicky transformován na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA). Následnou intracelulární akumulací POA dochází ke snížení pH cytoplasmy, porušení membránového transportu, inhibice metabolických dějů a buněčné smrti. Mezi specifické cíle PZA, POA a některé jejich derivátů (např. 5-chlorpyrazin-2-karboxamid a estery POA) patří například synthasa mastných kyselin typ I (FAS I), tj. enzym esenciální pro syntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, které slouží jako základní složka mykobakteriální buněčné stěny. Během posledních pěti let byly objeveny dva specifické cíle pouze pro POA a to ribozomální protein S1 (RpsA, klíčový pro syntézu proteinů) a aspartát dekarboxylasa (PanD, klíčová pro syntézu prekurzoru pro panthotenát a koenzym A). V roce 2015 byla popsána přesná krystalografická struktura RpsA, čímž do jisté míry přináší možnost cílené syntézy derivátů POA a povzbuzuje zájem o další modifikace této poměrně jednoduché molekuly.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo navázat na dlouholetý výzkum nových derivátů POA probíhající pod vedením prof. Doležala na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Vlastní práce se zabývá syntézou nových, v literatuře dosud nepopsaných derivátů POA, analýzou fyzikálně-chemických vlastností a testováním jejich biologické aktivity. V rámci experimentální práce byly připraveny *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy a *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidy substituované jak na pyrazinovém, tak fenylovém jádře (cílová struktura **I**). Posléze byly připraveny deriváty substituované na pyrazinovém jádře alkylamino, cykloalkylamino či fenylalkylamino skupinou (cílová struktura **II**). U připravených sloučenin byla primárně studována aktivita antimykobakteriální, doplňkově aktivita antibakteriální a antifungální, a u části látek též aktivita herbicidní. Na základě získaných dat byly diskutovány základní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. V rámci mezinárodní spolupráce bylo biologické hodnocení dále rozšířeno o testování antivirové aktivity a studium možného mechanismu účinku u sloučenin se slibnou antimykobakteriální aktivitou. S využitím dosažených výsledků byly navrženy další modifikace pyrazinového jádra.

V neposlední řadě bylo cílem této disertační práce přinést shrnutí problematiky tuberkulózy, současné terapie a trendů ve vývoji nových antituberkulotik.

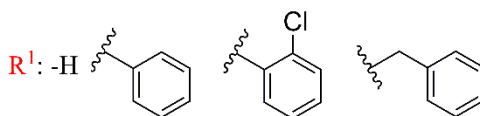
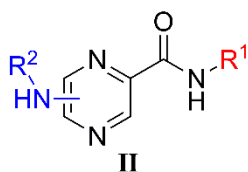


R^1 : -H, -Cl, -CH₃, -C(CH₃)₃

R^2 : -H, -Cl

$n = 0 - 1$

R^3 : -H, 2-Cl, 2-F, 2-CH₃, 2-CF₃, 3-Cl, 3-CF₃, 3-NO₂,
4-Cl, 4-Br, 4-CH₃, 4-OCH₃, 2,4-OCH₃, 2,4-Cl,
2-CH₃-5-F, 3-Cl-4-CH₃, 2-CH₃-5-I, 2-I-4-Cl

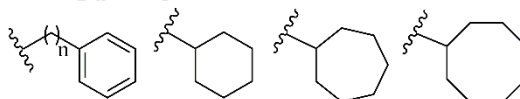


R^2 : -H

-CH₃ - -C₈H₁₇

-(CH₂)_nOH

-(CH₂)_nOCH₃



3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Tuberkulóza

3.1.1 Základní fakta

Tuberkulóza patří mezi infekční onemocnění vyvolané bakteriemi druhu *Mycobacterium*, nejčastěji druhem *Mycobacterium tuberculosis*. K dalším méně častým původcům onemocnění patří *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*.¹ Epidemiologickou situaci monitoruje Světová zdravotnická organizace (WHO), která každoročně vydává zprávu hodnotící aktuální šíření tuberkulózy, vývoj rezistence a koinfekce HIV. Dle WHO je přibližně 1/3 světové populace infikována mykobakteriemi a přibližně u 5 – 10 % dochází k progresi a rozvoji aktivního onemocnění². Nejvíce ohroženou skupinu představují osoby s oslabeným imunitním systémem (HIV), špatnými životními a sociálními podmínkami (bezdomovci a drogově závislí) a starší osoby¹.

K šíření onemocnění dochází převážně kapénkovým přenosem a inhalační cestou, kdy jsou mykobaktérie uvolňované z dýchacích cest osob s otevřenou (aktivní) formou tuberkulózy. Z tohoto důvodu jsou plíce nejčastěji napadeným orgánem, nicméně rozlišujeme i mimoplicní formy tuberkulózy (postižení mízních uzlin, pleury a kostí)¹.

3.1.2 Rezistentní formy tuberkulózy

Rezistence na běžně používaná antituberkulotika představuje celosvětově závažný problém³. S ohledem na pacienta přináší riziko nedostatečné adherence k léčbě (délka terapie, nežádoucí účinky) a tím riziko následného rozvoje rezistence na další antituberkulotika. Mezi hlavní příčiny vzniku rezistence patří nevhodná léková preskripce (monoterapie a kombinace nevhodných antituberkulotik), krátká doba léčby, nedostatečná adherence k léčbě, či omezená dostupnost léků (problematika rozvojových zemí)^{4, 5}. První zmínky o rezistentních kmenech se objevily již v roce 1944 a to krátce po uvedení streptomycinu na trh, kdy k rozvoji rezistence docházelo zejména v důsledku používání streptomycinu v monoterapii³.

Dle časového sledu mezi vznikem rezistence a zahájením léčby antituberkulotiky lze rozlišit tyto 3 základní typy rezistence:

- **Primární rezistence:** Rezistentní kmen izolovaný u pacientů, kteří nebyli dříve léčeni antituberkulotiky. Tento typ je založen na geneticky podmíněné necitlivosti mykobakterií na dané antituberkulotikum.
- **Získaná (sekundární) rezistence:** Původně citlivý kmen se v průběhu léčby nebo po jejím skončení stal rezistentní na lék v důsledku nevhodné léčby či v důsledku nedostatečné adherence k léčebným protokolům.

- **Iniciální rezistence:** Tento typ se týká pacientů, u nichž nelze vyloučit/prokázat dřívější užívání antituberkulotik. V podstatě se jedná o kombinaci primární a neodhalené získané rezistence⁴.

Obecně dochází k rozvoji rezistence těmito mechanismy: inaktivací/modifikací léčiva, změnou cílového místa, nedostatečnou kumulací léčiva uvnitř buňky v důsledku nízké permeability přes buněčnou stěnu či efluxem léčiva^{6,7}. Mezi další mechanismy patří inhibice aktivace prolečiv, která byla popsána například u antituberkulotik isoniazidu (INH)⁸ a pyrazinamidu (PZA)⁹.

Tabulka 1: *Mycobacterium tuberculosis* - mechanismus lékové rezistence^{3; 10-12}.

Léčivo (zavedeno do praxe)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Gen/y způsobují rezistenci	Funkce genu	Četnost mutace (%)
Isoniazid (1952)	0,02 – 0,2	<i>katG</i> <i>inhA</i> <i>ahpC</i> <i>kasA</i> <i>ndh</i>	Katalasa-peroxidasa Enoyl-ACP reductasa Alkyl-hydroxyperoxidasa β -Ketoacyl-ACP synthasa NADH dehydrogenasa	30 – 60 70 – 80 - - 9,5
Rifampicin (1966)	0,05 – 1	<i>rpoB</i>	RNA polymerasa (β podjednotka)	95
Pyrazinamid (1952)	16 – 50 (pH 5,5)	<i>pncA</i> <i>panD</i> <i>hadC</i>	Nikotinamidasa/pyrazinamidasa Aspartát dekarboxylasa β -Hydroxyacyl-ACP dehydratasa	72 – 97 - -
Ethambutol (1961)	1 – 5	<i>embB</i>	Arabinosyl transferasa	70 – 90
Streptomycin (1944)	2 – 8	<i>rpsL</i> <i>rrs</i> <i>gidB</i>	Ribozomální protein S12 16S rRNA rRNA methyltransferasa	65 – 67 8 – 21 33
Amikacin/kanamycin (1957)	2 – 4	<i>rrs</i>	16S rRNA	>60
Kapreomycin (1960)	-	<i>tlyA</i> <i>rrs</i>	2'-O-methyltransferasa 16S rRNA	80 40-100
Chinolony (1963)	0,5 – 2,5	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	DNA gyrasa (podjednotka A) DNA gyrasa (podjednotka B)	75 – 94
Ethionamid (1956)	2,5 – 10	<i>etaA/ethA</i> <i>inhA</i> <i>ethR</i>	Flavin monooxygenasa Enoyl-ACP reductasa Transkripční represor	>60 >60 -
Kyselina <i>para</i> - aminosalicylová (1946)	1 – 8	<i>thyA</i>	Thymidylát synthasa	36

MIC = minimální inhibiční koncentrace

V případě mykobakterií jsou za důvody primární rezistence nejčastěji považovány nízká propustnost mykobakteriální buněčné stěny, která je dána specifických složením a strukturou¹³, a dále pak efluxní systémy, které aktivně transportují léčiva (INH, rifampicin, chinolony, streptomycin a ethambutol) vně buňky¹⁴. Rezistence vzniká na základě spontánních

chromozomálních mutacích s frekvencí 10^{-6} až 10^{-8} replikací. Jelikož se na rozvoji rezistence u mykobakterií nepodílí plazmidy a transpozony, je pravděpodobnost vzniku rezistence na 3 současně podávaná antituberkulotika velice nízká (10^{-18} až 10^{-20})³. Amplifikace genetické mutace nevhodnou preskripcí nebo nesprávným užíváním antituberkulotik vede k rozvoji klinicky rezistentní tuberkulózy. Základní přehled mechanismů rezistence antituberkulotik viz **Tabulka 1** (zpracováno dle referencí^{3; 10-12}).

Dle citlivosti k jednotlivým antituberkulotikům rozlišujeme kmeny **monorezistentní** - rezistence pouze na jedno antituberkulotikum první volby, **polyrezistentní** - rezistence na více než jedno antituberkulotikum první volby mimo INH a rifampicin, **multirezistentní** a nejzávažnější typ představuje **extenzivní léková rezistence**¹⁵. Jako multirezistentní (Multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) označujeme tuberkulózu způsobenou kmenem *Mycobacterium tuberculosis* rezistentním minimálně vůči INH a rifampicinu. V případě extenzivní lékové rezistence (Extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB) je tuberkulóza způsobená kmenem *Mycobacterium tuberculosis* rezistentním vůči INH a rifampicinu, tj. jako v případě MDR-TB, a tento kmen je dále rezistentním i vůči fluorochinolonům a nejméně jednomu dalšímu intravenózně podávanému antituberkulotiku druhé volby (amikacin, kanamycin, kapreomycin)^{3; 16}. MDR/XDR fenotyp je způsoben postupným hromaděním mutací v různých genech, které kódují buď cílové místo nebo enzymy zapojené do aktivace léčiva^{3; 14}.

3.1.3 Problematika HIV koinfekce

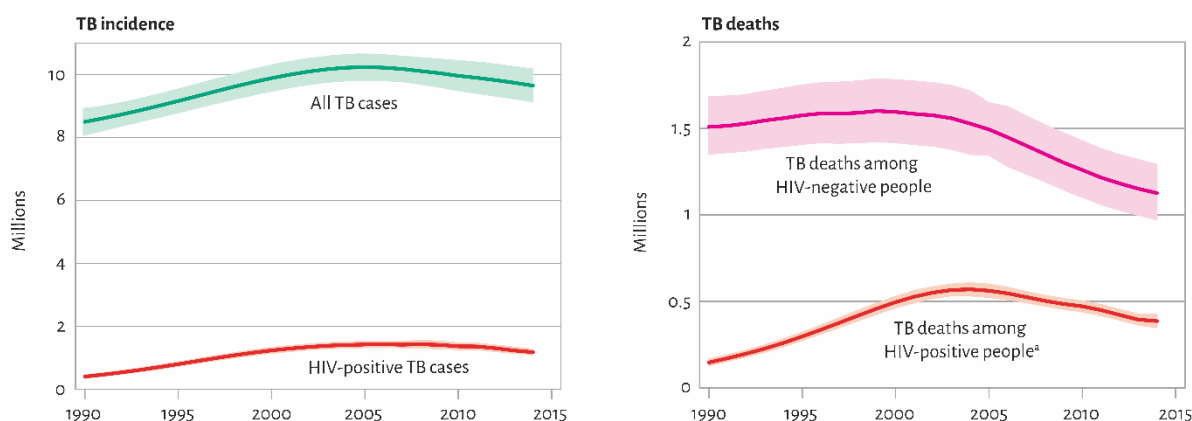
V současné době představuje koinfekce HIV a tuberkulózy závažný problém především v rozvojových zemích². Zásadní je u HIV-pozitivních pacientů prevence rozvoje tuberkulózy (možnost preventivního podávání INH), včasná diagnóza tuberkulózy (pravidelné odběry sputa) a intenzivní monitoring u již koinfikovaných pacientů¹⁷. Oslabení imunitního systému HIV infekcí výrazně zvyšuje pravděpodobnost rozvoje tuberkulózy (obzvláště v počátečních stádiích HIV infekce) a to přibližně 26ti-násobně oproti běžné HIV-negativní populaci^{2; 18}. U koinfikovaných pacientů bylo pozorováno zrychlení progresu HIV infekce (mykobakterie indukují pomocí protilátek replikaci HIV v T-lymfocytech a makrofázích)¹⁹. U HIV-pozitivních pacientů byla navíc pozorována reaktivace latentních forem tuberkulózy, extrapulmonální a diseminované formy tuberkulózy¹⁸, a dále též malabsorpce antituberkulotik a častější selhání léčby, což může významnou měrou přispívat k rozvoji rezistence²⁰.

Standardní terapeutické režimy u HIV-pozitivních pacientů jsou uvedeny v kapitole 3.3.2 Terapeutické režimy.

3.1.4 Epidemiologie tuberkulózy

Společně s infekcí HIV a malárií patří tuberkulóza mezi jedno z nejnebezpečnějších a nejčastějších infekčních onemocnění. Dle odhadů WHO pro rok 2014 onemocnělo přibližně 5,4 milionu mužů, 3,2 milionu žen a 1,0 milionu dětí, tedy celkově 9,6 milionu pacientů (133 případů na 100 000 obyvatel), z nichž 1,2 milionu tvořili HIV-pozitivní pacienti (viz **Obrázek 1**)². Nejvíce případů bylo zaznamenáno v jihovýchodní Asii a západním Tichomoří (celkově 58 %) a dále v Africe (28 %), viz **Obrázek 2**. Z jednotlivých států byl nejvyšší počet případů hlášen v Indii (23 %), Indonésii (10 %) a Číně (10 %). Ve srovnání s rokem 2013 došlo k mírnému nárůstu počtu hlášených případů (9,0 milionu případů, z nichž 1,1 milionu byli HIV-pozitivní pacienti²¹), nicméně prevalence ve srovnání s rokem 1990 celosvětově poklesla o 42 % a nárůst případů reflektuje spíše zkvalitnění hlášení do národních databází a poskytování dat než případné zvýšené šíření nemoci².

Obrázek 1: Odhad celkového počtu případů tuberkulózy a úmrtí následkem tuberkulózy v letech 1990 – 2014.*

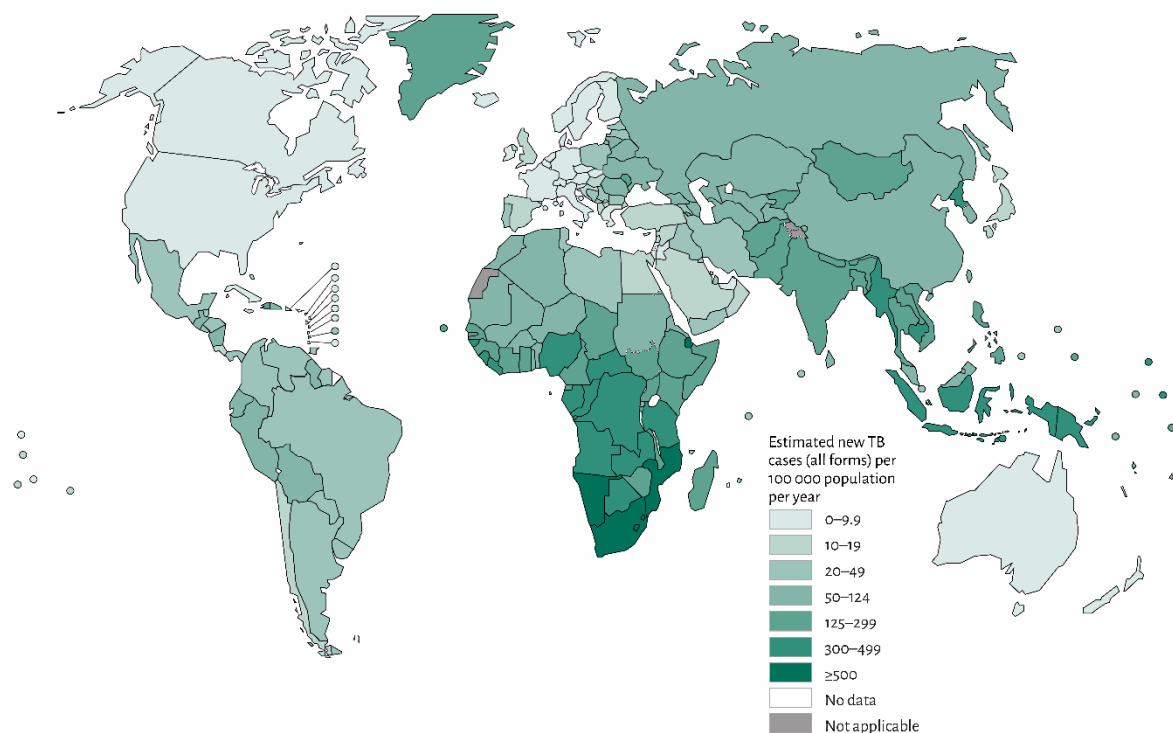


* Zelenou barvou odhad celkové incidence, růžovou barvou odhad mortalita u HIV-negativních pacientů, červenou barvou odhad celkové incidence respektive mortality u HIV-pozitivních pacientů, světlejší odstíny barev znázorňují pásy nejistoty. Převzato z WHO, Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22, 2015².

Co se rezistentních forem tuberkulózy týká, bylo v roce 2014 hlášeno 480 000 pacientů s MDR formou tuberkulózy, z nichž více než polovina (54 %) pocházela z Indie, Číny a Ruska². Přibližně 9,7 % původně diagnostikovaných MDR forem tuberkulózy bylo po stanovení citlivosti předefinováno na XDR formu².

Přestože úmrtnost od roku 1990 poklesla o 47 %, zemřelo v roce 2014 přibližně 1,5 milionu pacientů včetně 0,4 milionu HIV-pozitivních pacientů (viz. **Obrázek 1**)², což jsou počty srovnatelné s rokem 2013²¹.

Obrázek 2: Odhad incidence tuberkulózy, 2014.



Převzato z WHO, Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22, 2015².

Tabulka 2: Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC v ČR na 100 000 obyvatel.

Rok	Hlášená onemocnění TBC			Celkem na 100 000 obyvatel
	Dýchací ústrojí	Jiná	Celkem	
2000	1 244	198	1 442	14,0
2001	1 185	165	1 350	13,1
2002	1 037	163	1 200	11,8
2003	1 011	151	1 162	11,4
2004	909	148	1 057	10,4
2005	896	111	1 007	9,9
2006	956	117	973	9,5
2007	790	81	871	8,4
2008	793	86	879	8,4
2009	632	78	710	6,8
2010	621	59	680	6,5
2011	557	52	609	5,8
2012	552	59	611	5,8
2013	455	47	502	4,8
2014	464	50	514	4,9

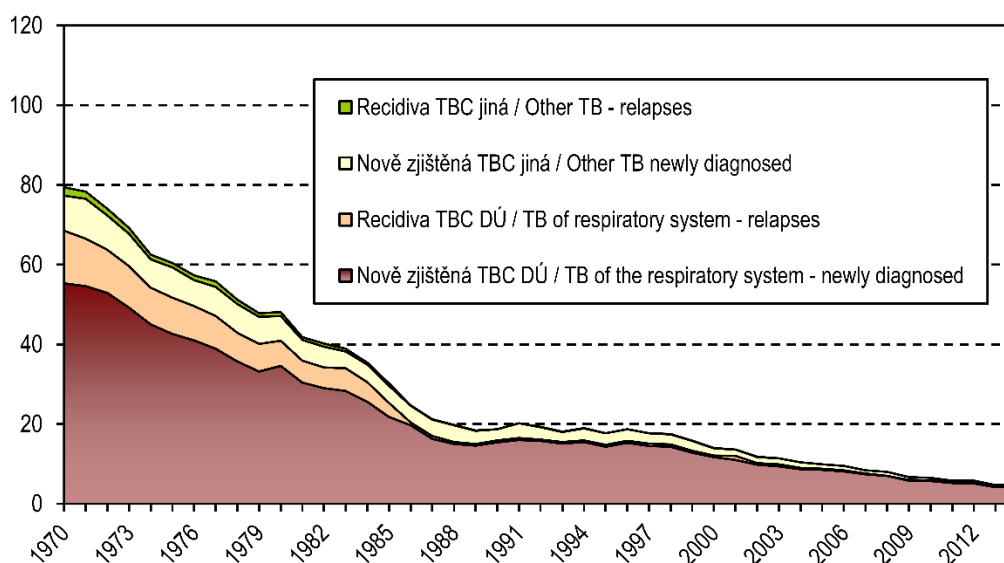
Zpracováno dle ÚZIS ČR. Zdravotnická statistika: Tuberkulóza a respirační nemoci 2014. 2015²².

Situace v České republice

V České republice bylo v roce 2014 hlášeno celkem 514 případů (4,9 případu na 100 000 obyvatel), z čeho 496 bylo nově zjištěné onemocnění (337 případů u mužů a 159 u žen, z 90 % se jednalo o plicní formu tuberkulózy)²². Nejvyšší počet hlášených případů ve srovnání s celorepublikovým průměrem byl zaznamenán v Praze (7,8/100 000 obyvatel), nejnižší pak v Jihočeském kraji (2,4/100 000 obyvatel)²². Ačkoliv došlo k mírnému nárůstu hlášených případů oproti roku 2013 (502 hlášených případů, tj. 4,8 případu na 100 000 obyvatel²³) lze z dlouhodobého hlediska konstatovat, že epidemiologická situace tuberkulózy na území České republiky je příznivá a počet zjištěných případů trvale klesá²²⁻²⁴. Dle dat z Registru tuberkulózy bylo v roce 2014 hlášeno 39 případům úmrtí na tuberkulózu (mortalita 0,4 na 100 000 obyvatel)²², což představuje mírný meziroční pokles (o 5 úmrtí²³).

Česká republika patří k zemím s nízkým výskytem tuberkulózy. Vývoj počtu všech hlášených případů tuberkulózy v České republice od roku 2000 shrnuje **Tabulka 2**, a graficky od roku 1970 **Obrázek 3**.

Obrázek 3: Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC v ČR na 100 000 obyvatel.



Převzato z ÚZIS ČR. Zdravotnická statistika: Tuberkulóza a respirační nemoci 2014. 2015²².

3.2 *Mycobacterium tuberculosis* – buněčná stěna

Mycobacterium tuberculosis patří mezi obligátně aerobní, Gram-pozitivní, acidorezistentní, nepohyblivé tyčky o šířce 0,3 až 0,6 μm a délce 1 až 4 μm , vyznačující se velmi pomalým růstem (generační doba přibližně 24 h) a v případě infekce intracelulární lokalizací v makrofázích^{25; 26}.

Mykobakteriální buněčná stěna je hlavním faktorem virulence a má zásadní význam pro růst a přežití obzvláště v makrofázích. Její unikátní vlastnosti jsou dány vysokým obsahem lipidů^{13; 27}. Nejdůležitější vrstvou buněčné stěny tvoří mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový (mAGP) komplex^{13; 27}, na který ve vrchní části navazuje glykolipidová vrstva a ve spodní části plasmatická membrána²⁸. Pochopení biosyntézy mAGP komplexu a dalších důležitých komponent mykobakteriální buněčné stěny může přispět k cílenému vývoji nových antituberkulotik.

3.2.1 Mykolyl-arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex

Jak již bylo řečeno, mykobakteriální buněčná stěna je bohatá na lipidy a je složená ze tří hlavních částí – peptidoglykanu, arabinogalaktanu a mykolových kyselin, které jsou vzájemně propojeny kovalentními vazbami a vytváří mAGP komplex^{13; 27}, viz **Obrázek 4**.

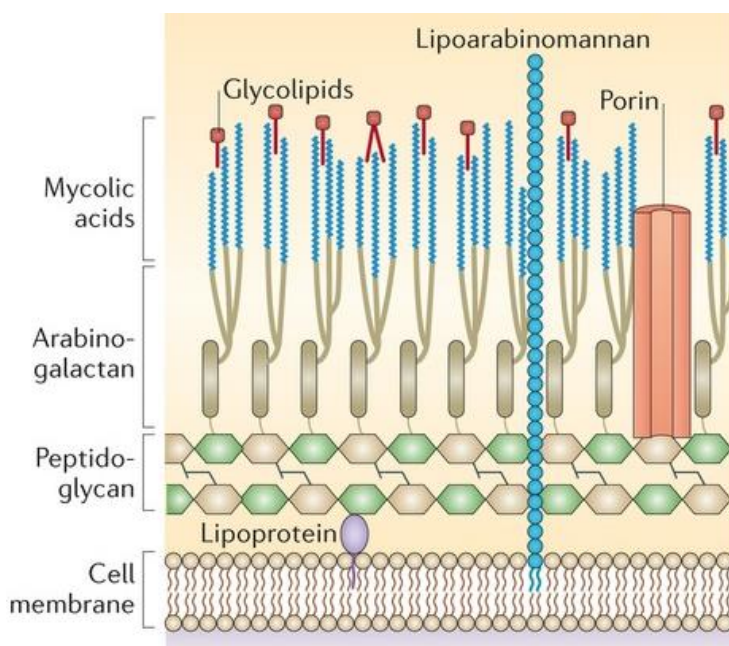
- **Peptidoglykan**

Peptidoglykan PG tvoří pomyslnou páteř mykobakteriální buněčné stěny, kdy lineární glykanové řetězce tvoří síť s postranními krátkými peptidy²⁹. Glykanové řetězce jsou tvořeny ze střídajících se jednotek *N*-acetylglukosaminu a kyseliny *N*-acetylmuramové vzájemně propojených β -1 \rightarrow 4 vazbou^{27; 29}. Propojení mezi PG a arabinogalaktanem (AG) vzniká fosfodiesterovou vazbou mezi kyselinou muramovou (z PG) a galaktanem (z AG).³⁰

- **Arabinogalaktan**

V případě AG se jedná o polymer složený z *D*-galaktofuranózy a *D*-arabinofuranózy, které se pravidelně nestřídají, ale vytváří samostatně vzájemně propojené bloky³¹. Přibližně 30 jednotek *D*-galaktofuranózy je lineárně propojeno β -1 \rightarrow 5 a β -1 \rightarrow 6 vazbami, a vytváří tak galaktanovou část AG. Arabinanová část je tvořena asi ze 70 jednotek *D*-arabinofuranózy propojených α -1 \rightarrow 5, α -1 \rightarrow 3 a β -1 \rightarrow 2 vazbami.³² Mykolové kyseliny (MA) se ve skupinách po čtyřech váží na koncové jednotky arabinanové části, nicméně 1/3 koncových jednotek zůstává volná³³.

Obrázek 4: Mykobakteriální buněčná stěna.



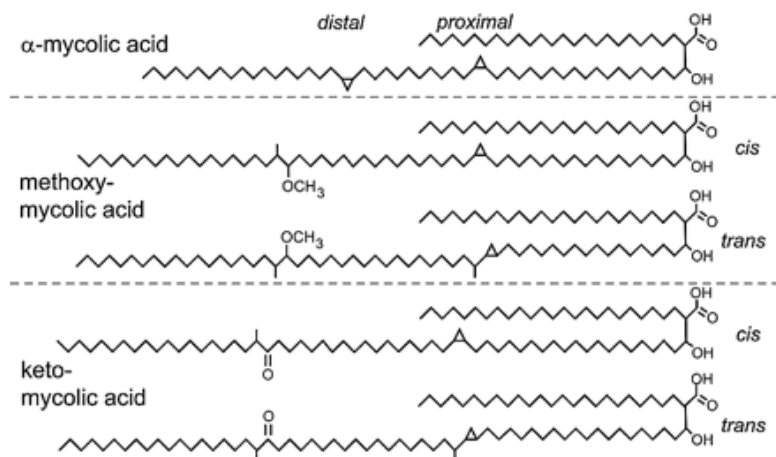
Převzato z Brown et al.³⁴.

- **Mykolové kyseliny**

MA jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (celkový počet $C_{60} - C_{90}$), které jsou rozvětvené v poloze α (proximální řetězec, $C_{22} - C_{24}$) a hydroxylované v poloze β ^{27; 35; 36}. Hlavní řetězec (tzv. distální řetězec) obsahuje jeden až dva cyklopropanové kruhy (konfigurace *cis* i *trans*), které se podílí na integritě buněčné stěny a chrání mykobakterie před oxidativním stresem^{36; 37}. Dle substituce na distálním řetězci rozlišuje 3 typy MA a to α -, methoxy- a keto-MA.

Mimo mAGP komplex jsou MA součástí glykolipidů, například trehalóza dimykolátů (TDM, tzv. cord faktor) a monomykolátů (TMM) lokalizovaných na buněčném povrchu²⁷.

Obrázek 5: Chemická struktura mykolových kyselin dle substituce na distálním řetězci.



Převzato z Takayama et al.³⁶.

3.2.2 Další složky buněčné stěny

Jak již bylo zmíněno, na vnější vrstvu mAGP komplexu tvořenou mykolovými kyselinami navazuje vrstva glykolipidů a společně vytváří mykobakteriální vnější membránu (mycobacterial outer membrane, MOM) tzv. mykomembránu. MOM obsahuje například výše zmiňované TDM a TMM, glykopeptidolipidy, sulfolipidy, dimykocerosáty a lipooligosacharidy²⁸.

TDM neboli Cord faktor se významnou měrou podílí na virulenci mykobakterií a ovlivňuje uspořádání skupiny mykobakterií do podlouhlých útvarů³⁸. Jeho aktivita závisí na lokalizaci mykobakterie. TDM chrání buňku před zničením makrofágy tím, že brání splnutí fagozomů obsahujících mykobakterie s lysozomy³⁹. TDM ovlivňuje imunitní reakce a přispívá k tvorbě a udržení granulomatózní reakce^{38; 40}.

Další významnou složku mykobakteriální buněčné stěny představuje glykolipid lipoarabinomanan (LAM), který je zakotvený v cytoplasmatické membráně a prostupuje mAGP komplexem i MOM. LAM tvoří heterogenní směs vysokomolekulárních fosforylovaných lipopolysacharidů obsahujících arabinózu a manózu²⁷. Spolu s cord faktorem patří LAM mezi hlavní faktory virulence. Může se též vázat na leukocyty (navození chemotaxe T-lymfocytů) a modulovat imunitní odpověď (aktivace makrofágů)⁴¹.

3.2.3 Plasmatická membrána

Plasmatická membrána má zásadní podíl na metabolismu lipidů, regulaci buněčné aktivity, příjmu živin z okolí a signalizačních reakcích²⁸, a je tvořena převážně strukturálními lipidy (fosfolipidy), jako jsou kardiolipin, fosfatidylethanolamin (PE), fosfatidylinositol (PI) a fosfatidylinositol mannosidy (PIMs), lipomanan (LM) a LAM. Součástí plasmatické membrány jsou mimo jiné i neutrální lipidy – triacylglyceroly (TAG) a cholesterol, které slouží jako zásobárna energie^{28; 42}. Poměry jednotlivých složek plasmatické membrány se mohou lišit v závislosti na mykobakteriálním kmenu a vnějších podmínkách⁴³.

- **Fosfatidylinositol** – dále modifikován na PIMs, LM a LAM, tj. esenciální složky mykobakteriální buněčné stěny. U patogenních druhů se podílí na modulaci imunitní reakce (například produkce cytokinů a inhibice zrání fagozomů)^{41; 44}.
- **Fosfatidylinositol mannosidy** – podílí se na udržování integrity plasmatické membrány⁴⁵.

3.3 Terapie tuberkulózy

3.3.1 Současná farmakoterapie

Současná farmakoterapie terapie tuberkulózy je založená na plně kontrolovaných léčebných režimech tzv. DOTS (Directly observed treatment short-course) doporučených WHO, které vychází z principů kombinované, kontrolované dvoufázové terapie s využitím antituberkulotik první a druhé linie. DOTS se významnou měrou podílí na redukci incidence tuberkulózy a zpomalení rozvoje lékové rezistence². Blíže jsou jednotlivé terapeutické režimy popsány v kapitole 3.3.2. Primární cíle léčby tuberkulózy spočívají v¹⁷:

- eradikace mykobakterií;
- zachování kvality života a produktivity pacienta;
- prevence úmrtí a pozdních následků onemocnění;
- zabránění přenosu tuberkulózy na další osoby;
- prevence rozvoje a šíření rezistentních forem tuberkulózy.

Antituberkulotika první volby

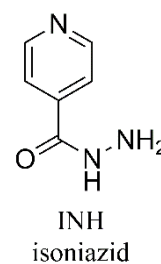
Mezi antituberkulotika první volby řadíme INH, rifampicin, ethambutol a PZA. Tato kapitola bude věnována stručnému popisu mechanismu účinku a rezistence o to u prvních třech jmenovaných léčiv, problematice PZA je věnována samostatná kapitola 3.4.

• Isoniazid

Hydrazid kyseliny isonikotinové, proléčivo, aktivace mykobakteriální katalasou-peroxidasou (KatG) za účasti NAD⁺⁴⁶.

Mechanismus účinku: Inhibice enoyl-(acyl-carrier-protein) reduktasy (enoyl-ACP reductasa, InhA), která je součástí komplexu syntasy mastných kyselin II (Fatty acid synthase II) zapojené do syntézy MA esenciálních pro mykobakteriální buněčnou stěnu^{47; 48}.

Rezistence: Převážně mutací nebo nadměrnou expresí genu kódujícího InhA (*inhA*)⁴⁷ a mutací genu *katG* kódujícího aktivační enzym KatG.^{46; 49}

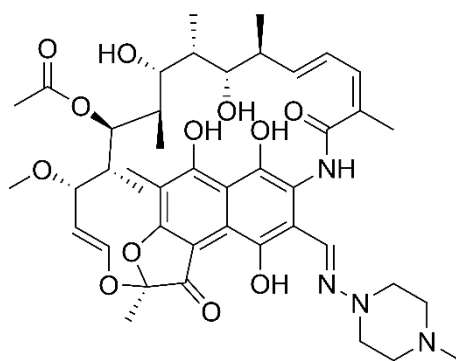


• Rifampicin

Ansamycinová antibiotika.

Mechanismus účinku: Vazba na β -podjednotku DNA-dependentní RNA polymerasy za vzniku stabilního komplexu, čímž dochází k inhibici syntézy nukleových kyselin⁵⁰.

Rezistence: V 95 % případů mutace genu *rpoB* kódujícího β -podjednotku RNA polymerasy – zkřížená s ostatními ansamycinovými antibiotiky^{3; 51; 52}.

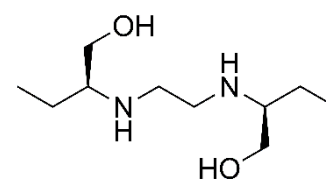


rifampicin

- **Ethambutol**

Odvozen od aminoalkoholu, chirální sloučenina, aktivní pouze *S,S*-(+)-isomer.

Mechanismus účinku: Nemá dosud plně objasněn. Hlavní podíl – inhibice syntézy AG a LAM^{53; 54}, tj. základních složek mykobakteriální buněčné stěny, inhibicí různých druhů arabinosyl transferas I-III^{55; 56}. Mezi další identifikované cíle ethambutolu patří inhibice syntézy spermidinu⁵⁷, inhibice glukózového metabolismu⁵⁸, transportu mykolátů⁵⁹ a syntézy TDM⁶⁰.



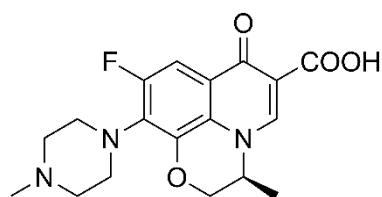
ethambutol

Rezistence: Mutace genů kódující arabinosyl transferasy I-III, primárně gen *embB*⁶¹.

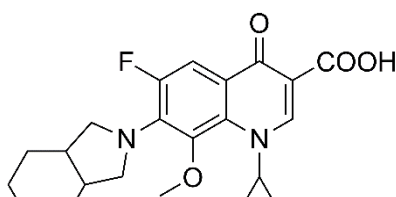
Antituberkulotika druhé linie

Antituberkulotika druhé linie hrají důležitou roli v terapii tuberkulózy rezistentní vůči léčivu či léčivům první linie, nicméně jejich používání přináší jistá rizika a to především závažných nežádoucích účinků a nižší účinnosti ve srovnání s léčivy první linie. V této části bude pouze pro úplnost uveden přehled antituberkulotik druhé linie a jejich mechanismus účinku. Bližší informace je možné získat například v přehledových člancích^{62; 63} a doporučení WHO pro terapii rezistentních forem tuberkulózy⁶⁴.

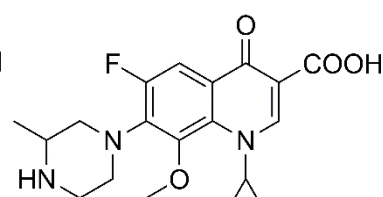
- **Fluorochinolony (levofloxacin/ofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin):** Fluorochinolony inhibují mykobakteriální DNA gyrasu (topoisomerasu II), čímž brání sestavení DNA po replikaci⁶⁵.



levofloxacin

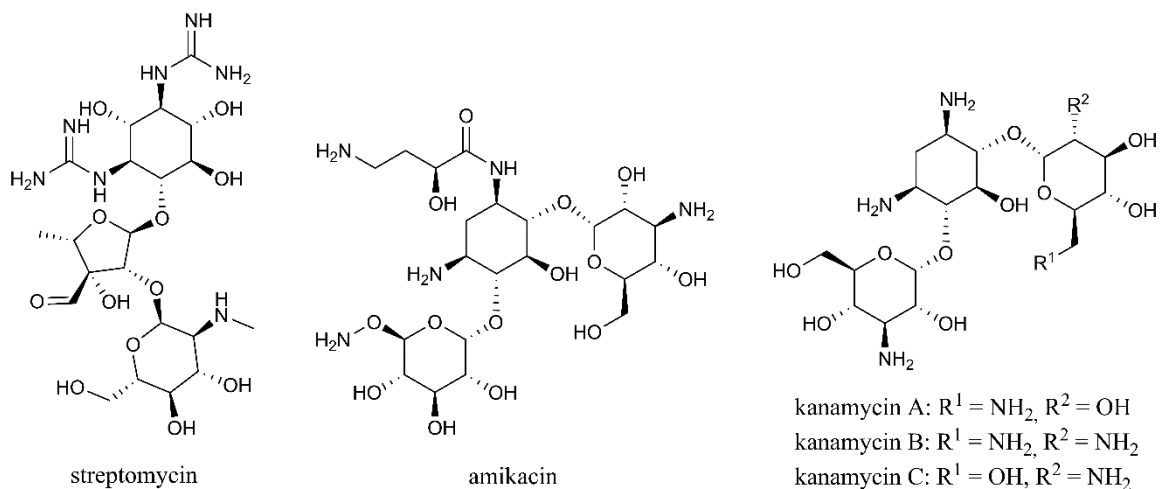


moxifloxacin

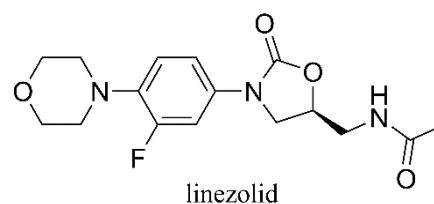
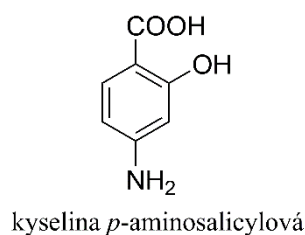


gatifloxacin

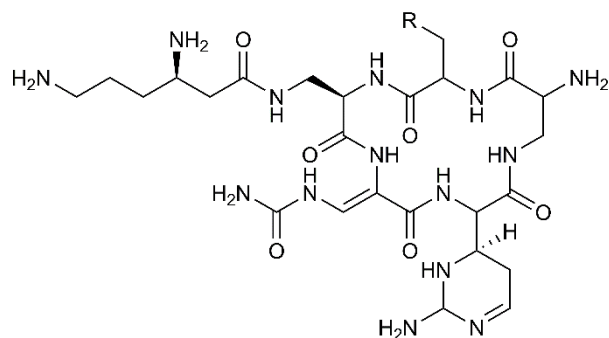
- **Aminoglykosidová antibiotika (streptomycin, amikacin, kanamycin):** Mechanismus účinku je založen na ireverzibilní vazbě aminoglykosidových antibiotik na 16S rRNA v 30S podjednotce ribozomu, čímž dochází k inhibici proteosyntézy^{66; 67}.



- **Kyselina *p*-aminosalicylová:** Mechanismus účinku nebyl plně objasněn, pravděpodobně dochází k inhibici syntézy folátů⁶⁸ či interakci se zpětným vychytáváním železa⁶⁹.

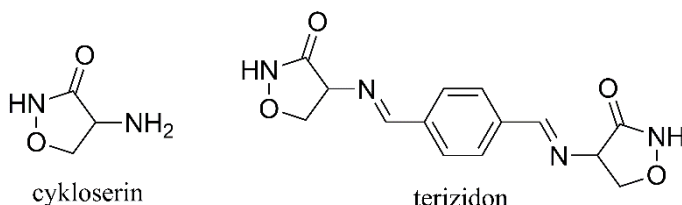


- **Oxazolidinony (linezolid):** Mechanismus účinku oxazolidinonů je založen na inhibici syntézy proteinů vazbou na 23S rRNA v 50S podjednotce ribozomu⁷⁰.
- **Glykopeptidová antibiotika (kapreomycin):** Inhibice proteosyntézy vazbou mezi 16S rRNA v 30S podjednotce ribozomu a 23S rRNA v 50S podjednotce⁷¹. Stejný mechanismus účinku byl popsán i u viomycinu⁷², který aktuálně není zařazen do terapeutických režimů rezistentních forem tuberkulózy⁶⁴.



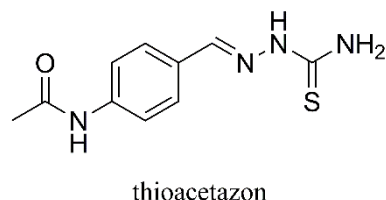
kapreomycin R = H, OH

- **Cykloserin a terizidon:** Cykloserin – cyklický analog alaninu, primárně inhibuje enzym *D*-alanin racemasu, čímž brání syntéze peptidoglykanu^{73; 74}. Minoritně se na celkovém účinku cykloserinu podílí inhibice *D*-alanin:*D*-alanin ligasy⁷³. V případě terizidonu se jedná o zdvojenou molekulu cykloserinu. Mechanismus účinku terizidonu je shodný s mechanismem cykloserinu⁶³



- **Thioacetazon**

Thioacetazon inhibuje cyklopropan-synthasu, čímž brání tvorbě cyklopropanového kruhu v distálním řetězci MA, které jsou esenciální složkou mykobakteriální buněčné stěny^{75; 76}



3.3.2 Terapeutické režimy

Standardní terapeutické režimy

Standardní terapeutické režimy vychází z doporučení WHO^{17; 77}, jehož cílem je zabránění chyb v preskripci a tím snížení rizika rozvoje rezistence, zvýšení dostupnosti léčiv a zajištění srovnatelných podmínek pro pacienty, snížení nákladů na léčbu, výškolení ošetřujícího personálu a v neposlední řadě vyhodnocení dosavadních výsledků terapeutických režimů¹⁷. **Tabulka 3** uvádí přehled doporučeného dávkování antituberkulotik první linie pro dospělé.

Standardní terapeutické režimy se skládají z dvou fází a to z kratší intenzivní fáze (obvykle po dobu 2 měsíců) a následné pokračovací fáze (4 a více měsíců). Během intenzivní fáze je obvykle podávána kombinace čtyř léčiv, v pokračovací fázi dvojkombinace. Pro zkrácení zápisu léčiv

používaných v daném režimu používá WHO vlastní zkratky (uvedeno v závorkách za jednotlivými léčivy), počet měsíců léčby uvádí číslovka před zkratkou¹⁷.

U pacientů s primoinfekcí tuberkulózy citlivé na léčiva první linie by během dvouměsíční intenzivní fáze měla být podávána kombinace INH (H), rifampicinu (R), PZA (Z) a ethambutolu (E), tj. zkráceně 2HRZE, následovaná čtyřměsíční pokračovací fází s kombinací INH a rifampicinu (4HR). V populacích se známou nebo předpokládanou vysokou mírou rezistence na INH by pokračovací fázi měla tvořit kombinace 4HRE¹⁷.

V případech již dříve léčených pacientů by před začátkem léčby měla být stanovena citlivost mykobakterií k léčivům první volby (minimálně k INH a rifampicinu). Pokud stanovení citlivosti není možné nebo aktuálně dostupné, pacient je léčen režimem 2HRZES/1HRZE/5HRE, kde označení S představuje streptomycin¹⁷.

Standardní léčba HIV-pozitivních pacientů s tuberkulózou citlivou na antituberkulotika se zásadně neliší od postupů používaných u HIV-negativních pacientů. U nově diagnostikovaných HIV-pozitivních pacientů s tuberkulózou je nejdůležitější zahájení léčby antituberkulotiky následované léčbou kotrimoxazolem a antiretrovirotiky⁷⁸, a standardní režim by se měl skládat z 2HRZE/4HR případně 2HRZE/4HRE. V případě nově vzniklé tuberkulózy u HIV-pozitivních pacientů již léčených antiretrovirotiky je nutné posoudit riziko možných lékových interakcí a případně obměnit používaná antiretrovirotika¹⁷.

Tabulka 3: Doporučené dávkování antituberkulotik první linie pro dospělé.

	Doporučená dávka			
	Denní dávka		Dávkování 3krát týdně	
	Dávka a rozmezí (mg/kg tělesné hmotnosti)	Maximální dávka (mg)	Dávka a rozmezí (mg/kg tělesné hmotnosti)	Denní maximální dávka (mg)
INH	5 (4 – 6)	300	10 (8 – 12)	900
Rifampicin	10 (8 – 12)	600	10 (8 – 12)	600
PZA	25 (20 – 30)	-	35 (30 – 40)	-
Ethambutol	15 (15 – 20)	-	30 (25 – 35)	-

Převzato a upraveno z WHO, Treatment of tuberculosis: guidelines - 4th edition. WHO/HTM/TB/2009.420., 2010¹⁷.

Terapie rezistentních forem tuberkulózy

V případě rezistentní formy tuberkulózy je důležité pro správné nastavení terapie stanovit citlivost daného izolátu na antituberkulotika. Při sestavování individuálního léčebného režimu se mimo citlivosti izolovaného kmene hodnotí též věk a celkový zdravotní stav pacienta, komorbidit (např. diabetes mellitus a renální insuficience) a koinfekce (HIV). V případě, že nelze

z jakéhokoliv důvodu provést testy citlivosti, použijí se standardní postupy založené na zkušenostech s terapií u reprezentativní skupiny pacientů^{79; 80}.

Mimo klasické dělení antituberkulotik na léčiva první a druhé linie, WHO též třídí antituberkulotika do pěti skupin na základě účinnosti, zkušeností s používáním a bezpečnosti⁶⁴, viz **Tabulka 4**.

Tabulka 4: Klasifikace léčiv pro terapii MDR-TB dle WHO.

1. Skupina – p. o. léčiva první volby	Isoniazid Rifampicin Pyrazinamid Ethambutol Rifabutin Rifapentin
2. Skupina – injekčně podávaná léčiva	Streptomycin Kanamycin Kapreomycin Amikacin
3. Skupina – fluorochinolony	Levofloxacin/Ofloxacin Moxifloxacin Gatifloxacin
4. Skupina – p. o. bakteriostatická léčiva druhé linie	Ethionamid Protionamid Cykloserin Terizidon Kyselina <i>p</i> -aminosalicylová a její sodná sůl
5. Skupina – léčiva s omezeným množstvím dat týkajících se účinnosti a bezpečnosti při dlouhodobém podávání v terapii rezistentních forem tuberkulózy	Bedachilin Delamanid Linezolid Klofazimin Amoxicilin/klavulanát Imipenem/cilastatin Meropenem Vysoké dávky isoniazidu (16-20 mg/kg/den) Thioacetazon Klarithromycin

Převzato a upraveno z WHO. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2014.11, 2014⁶⁴.

Při výběru léčiv postupuje dle následujících pravidel^{79; 80}:

- Použití nejméně čtyř různých látek účinných na daný klinický izolát – fluorochinolon + injekčně podané léčivo ze skupiny aminoglykosidů + léčivo první volby (dle citlivosti, nejčastěji PZA) + léčivo ze 4. skupiny.
- Výběr léčiv ze skupin 1 až 4 postupovat hierarchicky dle účinnosti.

- Vyhnout se léčivům s nižší bezpečností způsobujícím například závažné nežádoucí účinky či těžké alergické reakce.
- Léčivo z 5. skupiny může být zařazeno pouze v případě, že nelze vybrat 4 léčiva z předchozích skupin.
- Při použití injekčně podávaných léčiv je minimální délka intenzivní fáze 8 měsíců, následující fáze 8 – 12 měsíců a celková délka terapie nesmí být kratší než 20 měsíců.

Optimalizace léčebných režimů spolu s rychlou diagnózou a stanovením citlivosti kmene na léčiva první a druhé linie výrazně přispívá k zlepšení klinické odpovědi pacientů na léčbu. Pro úspěšnou terapii tuberkulózy vyvolanou rezistentními kmeny je nezbytný pravidelný monitoring. Odběry sputa a kultivace by měly být prováděny v měsíčních intervalech, dokud nebude pozorována konverze, tj. dvě po sobě jdoucí negativní kultivace odebrané v rozmezí třiceti dní. I poté by pacienti měli být sledováni ve dvou- až tříměsíčních intervalech⁸⁰.

3.3.3 Nová antituberkulotika v klinické praxi

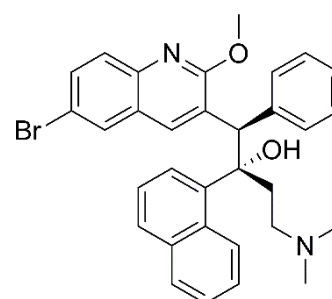
Bedachilin

V roce 2004 byla připravena série diarylchinolinů vykazující slibnou *in vitro* aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis*⁸¹. Z těchto látek byl posléze vybrán derivát označený jako R207910 (v klinických studiích též jako TMC207) – bedachilin, který vykázal výbornou aktivitu i vůči MDR a XDR formám tuberkulózy s hodnotami MIC v rozmezí od 2 do 60 ng/ml⁸², bez zkřížené rezistence k současně používaným antituberkulotikům první linie⁸³;

⁸⁴. Po necelých padesáti letech od registrace rifampicinu 1967 se tak bedachilin stal prvním zaregistrovaným antituberkulotikem primárně určeným pro terapii MDR-TB⁸⁵.

Jeho mechanismus účinku je založen na inhibici protonové pumpy mykobakteriální adenosintrifosfát (ATP) synthasy, konkrétně se váže na podjednotku c ATP synthasy, což vede ke konformačním změnám tohoto enzymu, ztrátě funkce a následně buněčné smrti^{84; 86}. Bedachilin prokázal účinnost i na nereplikující se mykobakterie, u nichž je zachována pouze zbytková aktivita ATP synthasy, k jejíž inhibici dostačují i nanomolární koncentrace bedachilinu⁸⁷. Díky této sterilizační aktivitě by bedachilin mohl významnou měrou přispět ke zkrácení délky terapie.

Bedachilin je intenzivně metabolizován cytochromem P450 (CYP3A4), což přináší riziko lékových interakcí se současně podávanými induktory nebo inhibitory CYP3A4⁸⁸. Současné podávání bedachilinu s induktory CYP3A4 jako jsou například efavirenz a rifamyciny (rifampicin, rifampin, rifapentin a rifabutin) může vést k výraznému snížení plasmatických hladin bedachilinu⁸²;



TMC207
bedachilin

⁸⁸. Na druhou stranu kombinace s inhibitory CYP3A4 (ciprofloxacín, erythromycin, klarithromycin, a antiretrovirotika ritonavir a lopinavir) může zvyšovat hladiny bedachilinu a tím i riziko možných nežádoucích reakcí^{88; 89}.

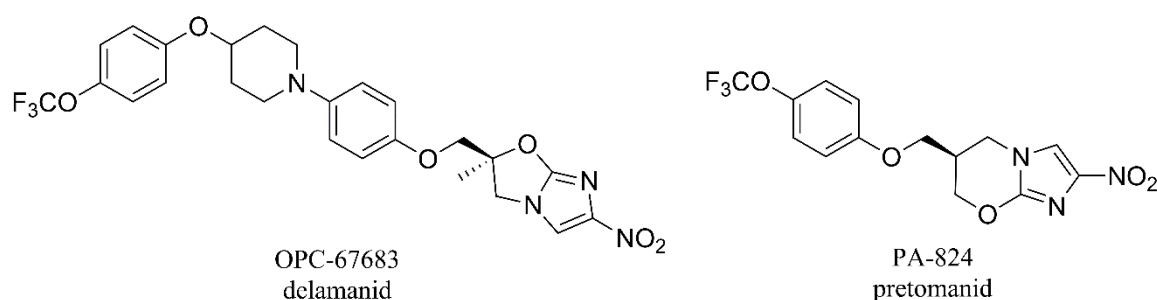
Delamanid

OPC-67683 neboli delamanid patří do skupiny nitroimidazolů, přesněji se jedná o derivát odvozený od 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]oxazolu. Toto perorálně podávané proléčivo je aktivováno pomocí deazaflavin-dependentní nitroreduktasy (Ddn)⁹⁰ a jeho primární metabolity inhibují buněčné dýchání a syntézu methoxy- a keto-MA, tj. hlavních složek mykobakteriální buněčné stěny⁹¹. Na usmrcení mykobakterií se podílí i oxid dusnatý uvolněný při metabolizaci delamanidu⁹¹.

Hodnoty MIC delamanidu vůči kmenům *Mycobacterium tuberculosis* (včetně rezistentních forem) se pohybují v rozmezí od 6 do 24 ng/ml⁹¹. *In vitro* aktivita byla pozorována i vůči atypickým mykobakteriím – *Mycobacterium kansasii* a *M. bovis*⁹¹. Delamanid navíc vykazuje sterilizační aktivitu a synergické působení s rifampicinem a ethambutolem^{91; 92}. V kombinaci s antituberkulotiky první volby nebyla pozorována zkřížená rezistence ani antagonistické působení⁹².

Delamanid má dlouhý biologický poločas (možnost intermitentního podávání) a navíc není metabolizován prostřednictvím cytochromu P450, což umožňuje jeho použití v terapii tuberkulózy u HIV-pozitivních pacientů (pozn. antiretrovirotika indukují, anebo jsou metabolizována enzymy cytochromu P450)⁹¹.

V dubnu 2014 byl delamanid zařazen na seznam základních léčiv používaných pro terapii plicní formy MDR-TB v případech, kdy nelze použít standardní léčebné režimy⁹³



Pretomanid

Pretomanid (v klinických studiích označovaný jako PA-824) patří do skupiny nitroimidazolů, přesněji se jedná o látku odvozenou od 6-nitro-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-*b*]oxazinu. Stejně jako delamanid je pretomanid proléčivem, které vykazuje dobrou aktivitu vůči kmenům *Mycobacterium tuberculosis* (včetně rezistentních kmenů, MIC v rozmezí od 15 do 250 ng/ml) a sterilizační

aktivitu. V kombinaci se současně používanými antituberkulotiky nebyla pozorována zkřížená rezistence^{94; 95}.

Mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy MA esenciálních pro syntézu mykobakteriální buněčné stěny⁹¹. Tento mechanismus účinku nicméně nevysvětluje účinek na nereplikující se mykobakterie, které v anaerobních podmínkách syntetizují mykoláty pouze v omezeném množství⁹⁶. Stejně jako delamanid, je i pretomanid aktivován prostřednictvím Ddn za vzniků tří metabolitů. Hlavním metabolitem je des-nitro pretomanid, při jehož vzniku dochází mimo jiné k uvolnění oxidu dusnatého^{90; 96}. A právě uvolnění oxidu dusnatého se významnou měrou podílí na inhibici nereplikujících se mykobakterií, tj. sterilizační aktivitě⁹⁶. Nutnost aktivace prostřednictvím Ddn přináší též riziko rozvoje rezistence. V případě pretomanidu bylo izolováno 183 rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis*, u nichž se v 83 % vyskytovala jednoduchá mutace jednoho z genů kódujících Ddn (*ddn*) nebo enzymy podílející se na syntéze deazaflavinu (geny *fgd*, *fbiA*, *fbiB* a *fbiC*). V důsledku mutace dochází ke změně katalytické domény potřebné pro aktivaci pretomanidu⁹⁷.

Aktuálně probíhají klinické studie, které se zabývají účinností a bezpečností pretomanidu v kombinované terapii tuberkulózy. Ve třetí fázi klinického testování se nachází kombinace pretomanidu, moxifloxacinu a PZA. Výsledky druhé fáze naznačují, že je tato kombinace bezpečná a dobře tolerovaná pacienty. Ve srovnání se standardní terapií HRZE u tuberkulózy vyvolané mykobakteriemi citlivými na tato antituberkulotika vykazala kombinace pretomanidu, moxifloxacinu a PZA výrazně vyšší baktericidní aktivitu během prvních osmi týdnů užívání. Podobných výsledků bylo dosaženo i u MDR kmenů *Mycobacterium tuberculosis*⁹⁸.

3.3.4 Antituberkulotika v preklinických a klinických studiích

Ačkoliv došlo za posledních 25 let k výraznému poklesu incidence tuberkulózy, největší problém stále představuje nárůst pacientů s rezistentními formami tuberkulózy a HIV koinfekce². Nová antituberkulotika by měla splňovat následující čtyři hlavní požadavky⁸²:

- Zkrácení doby léčby (aktivita i vůči nereplikujícím se mykobakteriím, synergické působení s jinými antituberkulotiky).
- Zvýšení adherence pacienta k léčbě – intermitentní podávání léčiv, minimum nežádoucích účinků a lékových interakcí.
- Zavedené léčiv s novým mechanismem účinku k zajištění aktivity i vůči rezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*.
- Snížení incidence latentních forem tuberkulózy pomocí kratších a bezpečnějších terapeutických režimů.

K identifikaci nových cílů působení antituberkulotik výraznou měrou přispělo sekvenování genomu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, které napomohlo rozpoznání jednotlivých genů a jejich funkcí⁹⁹. Detailnější popis možných cílů zásahu přesahuje rámec disertační práce. Shrnutí dosavadního pokroku v oblasti hledání nových antituberkulotik nabízí přehledový článek z roku 2015¹⁰⁰.

Tabulka 5 přináší aktuálních přehled sloučenin v různých fázích preklinického a klinického hodnocení. Mezi tyto látky patří jednak nové deriváty připravené obměnou struktury používaných antituberkulotik, dále pak sloučeniny ze zcela nových chemických skupin, ale také léčiva registrovaná v jiných indikacích.

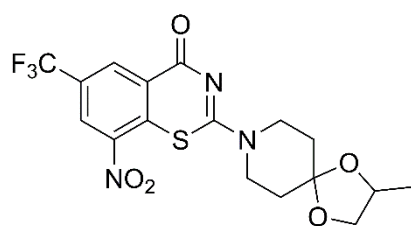
Tabulka 5: Přehled látek v preklinických a klinických studiích, aktualizováno v květnu 2016.

Preklinické studie	Klinické studie		
	Fáze I	Fáze II	Fáze III
<ul style="list-style-type: none"> • TBI-166 (Klofazimin) • CPZEN-45 • SQ609 • 1599 • PBTZ 169 • BTZ043 	<ul style="list-style-type: none"> • Q203 	<ul style="list-style-type: none"> • Sutezolid • SQ109 • Vysoké dávky rifampinu • Levofloxacin Kombinace • Bedachilin, pretomanid, PZA 	Kombinace: <ul style="list-style-type: none"> • Bedachilin + optimalizovaný základní režim pro MDR-TB • Delamanid + optimalizovaný základní režim pro MDR-TB • Rifapentin + moxifloxacin • Pretomanid + moxifloxacin + PZA

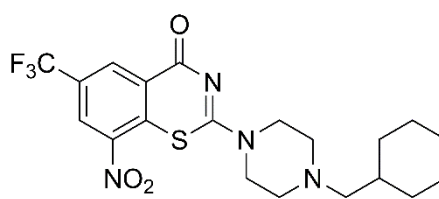
Převzato a upraveno z Working Group on New TB Drugs, Drug Pipeline. 2016¹⁰¹.

Benzothiazinony - BTZ043 a PBTZ 169

Novou skupinu látek se slibnou antimykobakteriální aktivitou představují benzothiazinony. Vlastní mechanismus účinku těchto látek je založen na inhibici dekaprenylfosforyl- β -D-ribóza-2'-epimerasy, která je potřebná pro syntézu dekaprenylfosfoarabinózy, tj klíčového prekurzoru arabinanu (jedna z hlavních složek mykobakteriální buněčné stěny)¹⁰²⁻¹⁰⁴. Vůdčí strukturou benzothiazinonu se stala látka BTZ043 se slibnou aktivitou i vůči rezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis*^{103; 105}. V kombinaci s INH, rifampinem, ethambutolem, bedachilinem, pretomanidem, moxifloxacinem, meropenem (bez klavulanátu) a SQ-109 nebylo pozorováno antagonistické působení, a v případě kombinace s bedachilinem byl pozorován synergický efekt¹⁰². PBTZ 169 je zástupcem novější generace benzothiazonů, které se vyznačují lepší rozpustností, rychlejší absorpcí a lepší účinností než BTZ043 *in vitro* i *in vivo* na myším modelu tuberkulózy¹⁰⁴. Aktuálně se obě látky nachází v preklinických studiích.



BTZ043



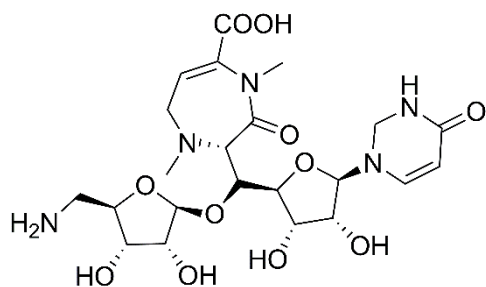
PBTZ169

Kaprazamyciny - CPZEN-45

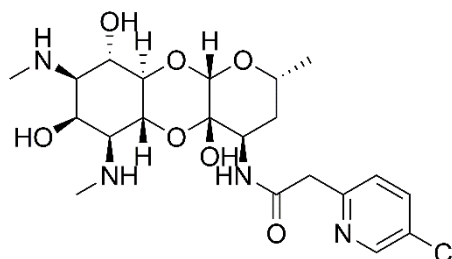
Kaprazamyciny patří mezi nové nukleosidová antibiotika izolovaná ze *Streptomyces* sp¹⁰⁶ účinná na Gram-pozitivní bakterie a mykobakterie¹⁰⁷. Kaprazamyciny inhibují translokasu I (MraY), která je zapojena do syntézy peptidoglykanu, tj. esenciální složky bakteriální buněčné stěny¹⁰⁷.

Při studiu vztahů mezi strukturou a účinkem (SAR) byla určena základní část molekuly – kaprazen – nezbytná pro zachování antimykobakteriální aktivity¹⁰⁸. Následnou modifikací kaprazenu byla připravena série semi-syntetických derivátů, z nichž se jako nejslibnější derivát jeví CPZEN-45¹⁰⁸. Ve srovnání s kaprazamyciny má CPZEN-45 užší spektrum účinku, což je dáno především jiným mechanismem účinku. CPZEN-45 inhibuje *N*-acetylglukosamin-1-fosfotransferasu, která je nezbytná pro iniciaci syntézy mykobakteriální buněčné stěny¹⁰⁷.

CPZEN-45 se aktuálně nachází v preklinické fázi testování. *In vitro* byla pozorována aktivita i na nereplikující se mykobakterie, *in vivo* i na XDR kmeny *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰⁹.



CPZEN-45



1599

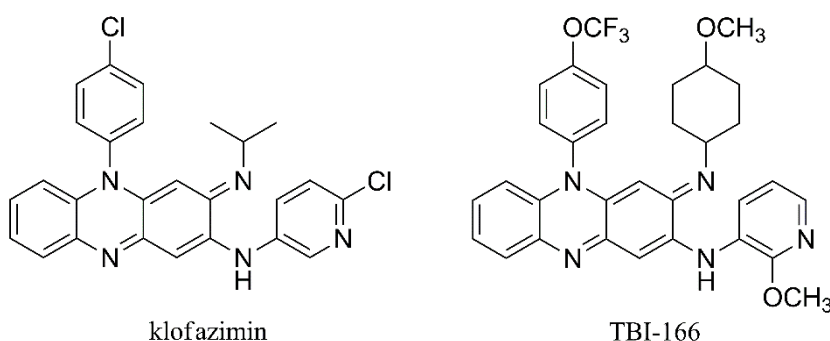
Analoga spektinomycinu - 1599

Spektinomycin patří mezi antibiotika dříve používaná v terapii gonorey, jehož mechanismus účinku je založen na inhibici translace, čímž inhibuje syntézu proteinů¹¹⁰. Jeho antimykobakteriální aktivita je nicméně zanedbatelná. Semi-syntetická analogy spektinomycinu vykázaly slibnou aktivitu i vůči MDR a XDR kmenům *Mycobacterium tuberculosis* a nebyla u nich pozorována zkřížená rezistence s běžně užívanými antituberkulotiky první a druhé linie¹¹¹. Mechanismus účinku, stejně jako u spektinomycin, spočívá v inhibici translace u bakterií (neinhibují translaci v savčích buňkách). Vůdčí strukturou je látka označovaná 1599, která kromě aktivity vůči

rezistentním kmenům vykazala *in vivo* aktivitu vůči latentním formám tuberkulózy, tj. sterilizační aktivitu¹¹¹.

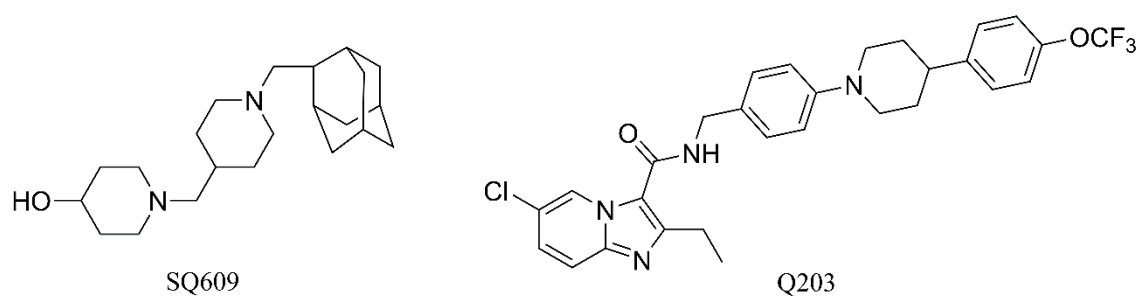
Riminofenaziny - TBI-166

Základní látku skupiny riminofenazinů představuje klofazimin (původně připravený jako barvivo), slibné léčivo zkracující celkovou dobu terapie u MDR forem tuberkulózy¹¹². Nicméně jeho podáváním dochází k akumulaci v orgánech a tukové tkáni, a následné změně barvy pokožky. Tento nežádoucí účinek se podařilo odstranit přípravou méně lipofilních derivátů, z nichž TBI-166 prokázal vyšší *in vitro* aktivitu než klofazimin vůči replikujícím se mykobakteriím i rezistentním kmenům^{113; 114}. Aktuálně se TBI-166 nachází v preklinické fázi testování, přesný mechanismus účinku není znám.



Dipiperidiny - SQ609

Mezi další slibné sloučeniny v preklinické fázi testování patří dipiperidinový derivát SQ609, který byl vybrán na základě *in vitro* a *in vivo* testování¹¹⁵. Mechanismus účinku dipiperidinových derivátů nebyl přesně objasněn, pravděpodobně interferují se syntézou mykobakteriální buněčné stěny¹¹⁶.



Imidazopyridiny - Q203

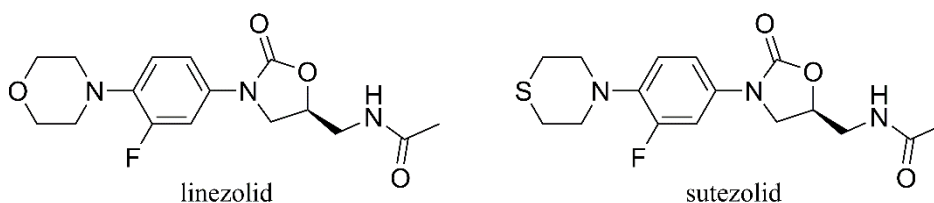
Vedoucí sloučeninou této skupiny látek je Q203, která byla připravena optimalizací struktury imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-karboxamidu. Jak bylo zjištěno, amidová část molekuly je důležitá pro zachování aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a zlepšení biologické dostupnosti látky¹¹⁷. Mechanismus účinku spočívá v zásahu do dýchacího řetězce, konkrétně ve vazbě

na *b* podjednotku komplexu cytochromu *bc₁*. Inhibicí tohoto komplexu dochází k následně inhibici syntézy ATP¹¹⁸.

Dle výsledků studií Q203 inhibuje růst MDR i XDR kmenů *Mycobacterium tuberculosis* (klinické izoláty) a to v nanomolárních koncentracích¹¹⁸. Na myším modelu tuberkulózy byla pozorována účinnost v dávkách nižších než 1 mg/kg¹¹⁸. Q203 se aktuálně nachází v I fázi klinického testování a stala se předlohou sloučeninou pro optimalizaci struktury¹¹⁷.

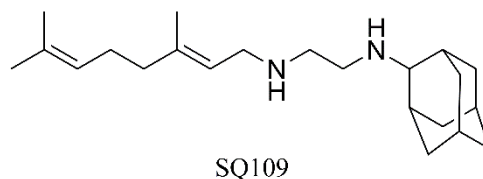
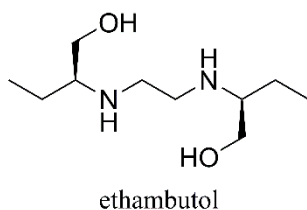
Oxazolidinony - sutezolid

Sutezolid (PNU-100480) patří stejně jako linezolid mezi oxazolidinony. Mechanismus účinku oxazolidinonů je založen na inhibici syntézy proteinů vazbou na 23S rRNA v 50S podjednotce ribozomu⁷⁰. Sutezolid a linezolid vykázali *in vitro* pouze bakteriostatický účinek na replikující se mykobakterie, nicméně v případě nereplikujících se mykobakterií účinek baktericidní. Ve srovnání s linezolidem byla pozorována výrazně vyšší aktivita sutezolidu *in vivo* na myším modelu latentní tuberkulózy¹¹⁹. Vyšší aktivita ve srovnání s linezolidem byla pozorována i v případě rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis*¹²⁰. Po perorálním podání je sutezolid rychle oxidován na aktivní metabolit (PNU-101603), jehož aktivita je výrazně nižší ve srovnání s parentní látkou¹²¹. Sutezolid byl velmi dobře tolerován jak ve fázi I klinického hodnocení na zdravých dobrovolnících¹²², tak ve fázi II na pacientech s tuberkulózou¹²³.



Ethylendiaminy - SQ109

Ethylendiaminy patří mezi strukturní analoga ethambutolu¹²⁴ a SQ109 byl vybrán jako neslibnější látka ze série 69 derivátů¹²⁵. Na rozdíl od ethambutolu jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici MmpL3, membránového transportéru pro TMM. Následkem toho dochází k hromadění TMM (prekurzor TDM) v cytosolu, neprobíhá syntéza TDM a nedochází k vazbě mykolátů na AG v buněčné stěně¹²⁶. V nedávné době bylo zjištěno, že SQ109 a jeho analoga inhibují též syntézu vitamínu K, transport elektronů, buněčné dýchání a syntézu ATP, ovlivňují pH gradient a membránový potenciál potřebný pro membránový transport¹²⁷. Mnohé z těchto cílů byly identifikovány i u dalších druhů bakterií, hub a *Plasmodium falciparum*¹²⁷. V *in vitro* studiích bylo pozorováno synergické působení mezi SQ109 s rifampinem, bedachilinem a sutezolidem^{128; 129}. V časně fázi klinického hodnocení (fáze IIa) byl SQ109 dobře tolerován pacienty s tuberkulózou, nicméně nebyl pozorován baktericidní efekt samostatně podávaného SQ109 ani synergický efekt v kombinaci s rifampicinem¹³⁰.



Ve druhé fázi klinického testování se aktuálně nachází i rifampicin, u kterého aktuálně probíhá hodnocení podávání ve vysokých dávkách¹³¹. V *in vitro* i *in vivo* studiích bylo potvrzeno, že podávání vyšších dávek zvyšuje baktericidní a sterilizační aktivitu rifampicinu, a přispívá ke zkrácení délky terapie^{131; 132}. Dle dosavadních výsledků klinického hodnocení lze usoudit, že podávání rifampicinu v dávkách 35 mg/kg u pacientů s tuberkulózou citlivou na antituberkulotika je bezpečné a podávaná dávka byla dobře tolerována pacienty¹³³. Ve srovnání se standardní dávkou rifampicinu, tj. 10 mg/kg, byl při dávce 35 mg/kg pozorován výrazný pokles počtu jednotek tvořících kolonie na mililitr sputa¹³³.

Aktuálně též probíhá druhá fáze klinického testování v případě levofloxacinu (schválený WHO pro kombinovanou terapii rezistentních forem tuberkulózy⁶⁴), která má za cíl určit optimální dávkovací algoritmus k dosažení maximální účinnosti a bezpečnosti levofloxacinu (výsledky nebyly doposud publikovány).

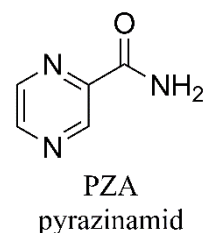
V současné době se ve fázi III klinického hodnocení nachází především kombinace nově zavedených léčiv se standardizovanými režimy pro léčbu MDR forem tuberkulózy (bedachilin nebo delamanid) nebo antituberkulotiky první a druhé linie (pretomanid + moxifloxacin + PZA)¹⁰¹.

Jednu z možností prevence rozvoje tuberkulózy představuje i vakcinace BCG vakcínou (atenuovaný kmen *Mycobacterium bovis*), která ovšem vykazuje nedostatečnou účinnost zejména proti rozvoji plicních forem tuberkulózy u dospělých a dospívajících. Ve snaze o zefektivnění vakcinace byla připravena řada vakcín, z nichž 13 se aktuálně nachází v různých fázích klinického vývoje¹³⁴.

Mimo samotný vývoj nových antituberkulotik a vakcín je důležitá i prevence rozvoje rezistentních forem tuberkulózy a to především přesným určením citlivosti kmene na antituberkulotika, dodržováním standardních terapeutických režimů a důsledným sledováním odezvy pacienta na terapii.

3.4 Pyrazinamid

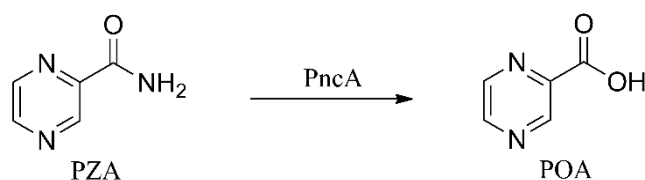
PZA, analog nikotinamidu, patří mezi antituberkulotika první volby a tvoří důležitou součást terapeutických režimů zejména z důvodu sterilizační aktivity a účinnosti v kyselém prostředí¹³⁵. Usmrcuje nereplikující se mykobakterie, které přežívají uvnitř makrofágů^{136; 137}, a v kombinaci s INH a rifampicinem přispívá ke zkrácení délky terapie na šest měsíců (u kmenů citlivých na tyto antituberkulotika)^{11; 137}.



3.4.1 Mechanismus účinku

Ačkoliv byla antituberkulotická aktivita PZA objevena již v roce 1952 a posléze byl PZA zaveden do terapie tuberkulózy, jeho přesný mechanismus účinku nebyl až do nedávné doby známý^{138; 139}. Původní hypotéza předpokládala nespecifický mechanismus účinku, kdy PZA jakožto proléčivo podléhá po vstupu do mykobakteriální buňky enzymatické konverzi na kyselinu pyrazinkarboxylovou (POA), tj. vlastní účinnou látku¹⁴⁰. Přibližně od roku 2000 se objevilo několik teorií popisujících možný specifický účinek PZA a POA. Jednotlivé teorie jsou popsány níže v textu.

Schéma 1: Konverze PZA na POA.



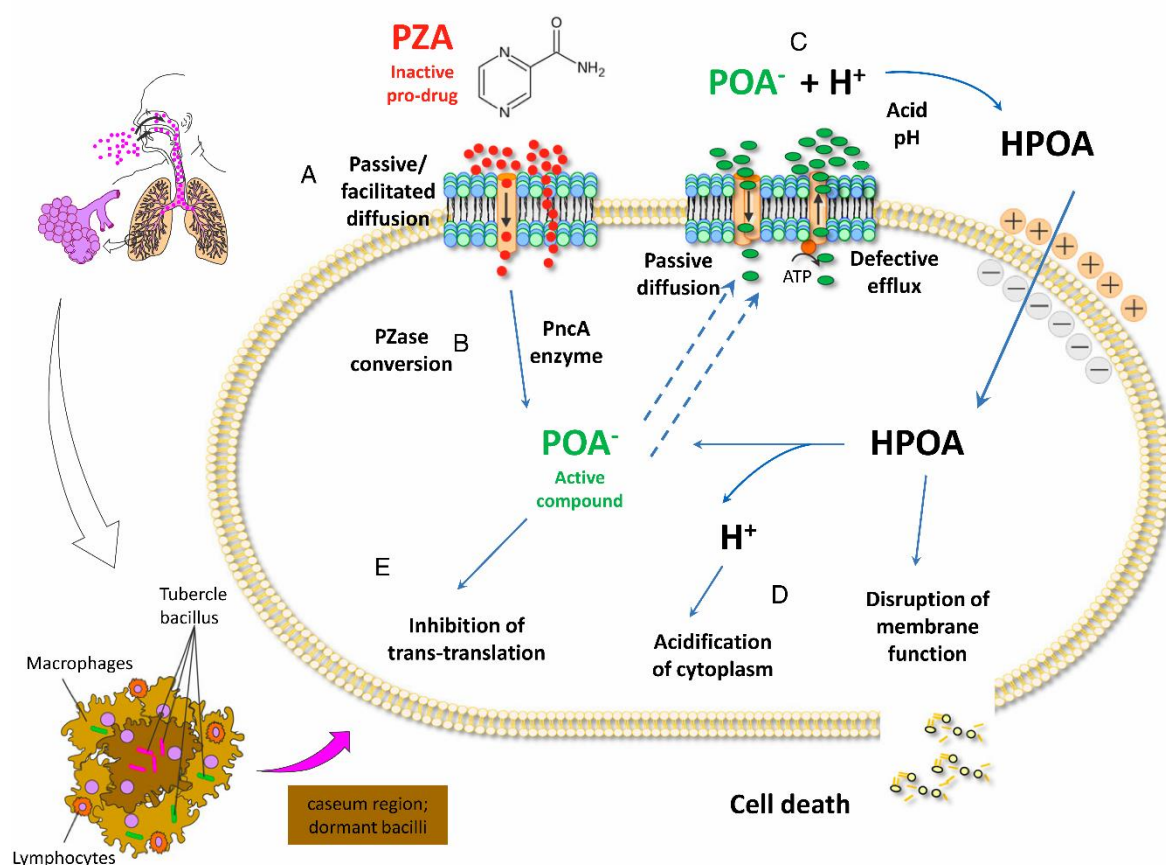
Nespecifický mechanismus účinku

PZA vstupuje pasivní difuzí do mykobakteriální buňky, kde je působením nikotinamidasy/pyrazinamidasy (PncA) následně konvertován na POA ($pK_a = 2.9$)¹⁴¹. Převážně efluxním mechanismem a pasivní difuzí vystupuje POA vně buňky do extracelulárního prostoru a pokud je toto prostředí kyselé (například $pH = 5,5$), malá část POA přijímá proton a stává se HPOA (nedisociovaná forma)¹⁴². V této formě HPOA snadno proniká pasivní difuzí do intracelulárního prostoru. Pasivní difuze HPOA převažuje nad nedostatečným efluxním mechanismem, což vede ke kumulaci POA uvnitř buňky. HPOA vnáší do cytoplasmy protony, což vede k jejímu okyselení a inhibici enzymů životně důležitých pro přežití mykobakterie. Navíc změna pH gradientu negativně ovlivňuje membránový transport, což vede k inhibici syntézy proteinů a RNA^{141; 142}, viz **Obrázek 6**.

Aktivita PZA je silně závislá na pH okolního prostředí a narůstá s aciditou. Pokud je však pH extracelulárního prostoru neutrální až alkalické, dochází ke kumulaci POA vně buňky, což vysvětluje aktivitu PZA pouze v kyselém prostředí a ne při neutrálním pH¹³⁷.

Nespecifický účinek PZA/POA je v případě *Mycobacterium tuberculosis* závislý na nedostatečném efluxním mechanismu pro POA. Perzistující mykobakterie s nízkou metabolickou aktivitou mají navíc nedostatek energie pro eflux POA, čímž se zvyšuje jejich citlivost k PZA/POA¹³⁷. Navíc některé látky snižující energetický metabolismus mykobakterie zvyšují účinek PZA^{141; 143}. Tento efekt je specifický pro PZA a byl popsán například u *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCCD), rotenonu, valinomycinu, dinitrofenolu, kyanidu a azidů^{141; 143}. Zvýšení aktivity PZA *in vitro* bylo pozorováno i po snížení energetického metabolismu kultivací v substrátově chudém médiu, při nižších teplotách (15 – 25 °C) či v anaerobních podmínkách^{144; 145}.

Obrázek 6: Konverze PZA na POA, nespecifický mechanismus účinku POA a inhibice trans-translace.



Membránový transport PZA (A); konverze PZA na POA (B); konverze POA na HPOA v kyselém prostředí (C); přestup HPOA do mykobakterie, acidifikace cytoplasmu a porucha membránové funkce (D); inhibice trans-translace vazbou POA na RpsA (E). Převzato z Miotto et al.¹⁴⁶.

Specifický mechanismus účinku

• Synthasa mastných kyselin I

Synthasa mastných kyselin I (Fatty Acid Synthase I, FAS I) je komplex enzymů podílejících se na syntéze vyšších mastných kyselin s dlouhým řetězcem ($C_{16} - C_{24/26}$) z acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) a malonyl-CoA¹⁴⁷. Vyšší mastné kyseliny jsou dále využívány k syntéze základních složek mykobakteriální buněčné stěny¹³.

Nejprve byla inhibice FAS I navržena jako mechanismus účinku pro 5-chlorpyrazin-2-karboxamid (5-Cl-PZA)¹⁴⁸. Zimhony et al.¹⁴⁸ identifikovali gen *fas1* kódující FAS I, který byl zodpovědný za rozvoj rezistence k 5-Cl-PZA u *Mycobacterium avium*, *M. bovis* BCG i *M. tuberculosis*. V případě kmene *Mycobacterium tuberculosis* byla inhibice FAS I posléze potvrzena jako specifický cíl jak pro PZA tak i POA¹⁴⁸. Avšak studie na izolovaném enzymu nepotvrdila PZA jako inhibitor FAS I¹⁴⁹. Nicméně v roce 2007 Ngo et al.¹⁴⁷ potvrdil FAS I jako specifický cíl pro PZA a POA, a zároveň také popsal vztah mezi inhibicí FAS I a koncentrací PZA a POA (se vzrůstající koncentrací se zvyšovala míra inhibice FAS I, platí i pro 5-Cl-PZA).

Autoři studií se dále zabývali inhibiční aktivitou různých derivátů PZA a POA. Především se jednalo o analoga 5-Cl-PZA a estery POA (POE, např. *n*-propylester, nehalogenované POE, 5-chlor-POE, 5-fluor-POE)^{147; 150}. Ze studovaných látek vykázaly nejsilnější inhibiční aktivitu (výrazně převyšující PZA a POA) halogenované estery POA (5-fluor-POE, následované 5-chlor-POE) a nehalogenované POE¹⁴⁷.

Sayahi et al.¹⁵¹ publikoval v roce 2011 studii, ve které pomocí NMR potvrdil vazbu PZA i POA na izolovanou FAS I a určil vazebné místo PZA. Přesné vazebné místo pro POA nebylo určeno, nicméně na základě výsledků bylo stanoveno, že PZA i POA inhibují FAS I odlišným mechanismem. PZA soutěží s NADPH (kofaktor FAS I) o vazebné místo, které se pravděpodobně nachází v katalytické doméně β -ketoacyl reduktasy a/nebo β -enoyl reduktasy (dvě ze sedmi podjednotek FAS I)¹⁵¹. Stejný mechanismus inhibice, tj. kompetice s NADPH o vazebné místo na FAS I, bylo potvrzeno i pro 5-Cl-PZA¹⁵².

• Ribosomální protein S1

V roce 2011 byl publikován nový specifický cíl pro POA a to ribosomální protein S1 (RpsA)¹⁵³, který zprostředkovává vazby mezi ribozomem a tmRNA. POA se váže na C-konec RpsA (30S podjednotka)¹⁵⁴, čímž dochází k inhibici trans-translace nezbytné pro syntézu proteinů.

Trans-translace hraje zásadní roli v kontrole kvality syntézy proteinů, a je důležitá pro životaschopnost buňky a odpověď na stres¹⁵⁵. Trans-translace se aktivuje při předčasném ukončení elongace proteinů, pomocí ribonukleoproteinového komplexu (tmRNP) uvolňuje mRNA z ribozomu a podílí se na degradaci vzniklého defektního proteinu¹⁵⁶. Komplex tmRNP je tvořen transferovou-mediátorovou RNA (tmRNA), malým proteinem SmpB, elongačním faktorem Tu a ribosomálním proteinem S1¹⁵⁶. Poté co dojde k uvolnění mRNA z ribozomu, tmRNA se váže

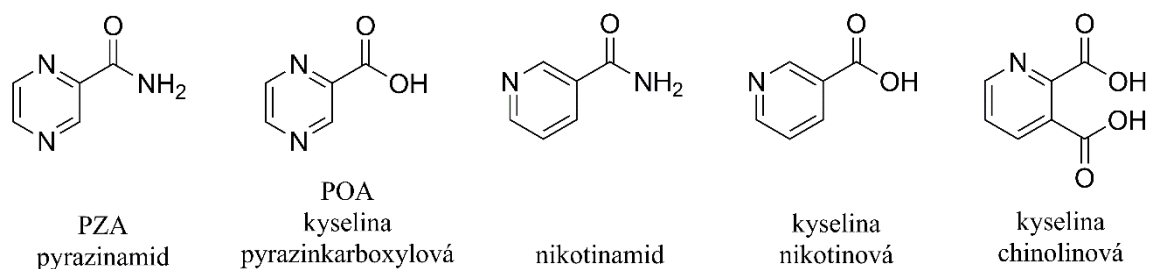
na její místo a stává se předlohou pro translaci. Při následné translaci tmRNA vnáší do defektního proteinu značku (sekvence aminokyselin), čímž je vzniklý protein určen k degradaci¹⁵⁶.

Inhibicí trans-translace u nereplikujících se mykobakterií lze vysvětlit schopnost PZA eradikovat i perzistující mykobakterie, které mají nedostatek ribozomů a zachování proteosyntézy je zásadní pro jejich přežití¹⁵³. Trans-translace je důležitá zejména při stavech, které mohou vést k častějším chybám při proteosyntéze. Takto je možné vysvětlit jak některé stresové stavy (kyselé pH, hypoxie, látky negativně ovlivňující metabolismus a jiné léky) mohou potencovat aktivitu PZA^{11; 141}.

• Fosforibosyl transferasa kyseliny chinolinové

Již dříve byla vyslovena domněnka, že by se PZA jakožto analog nikotinamidu mohl podílet na biosyntéze NAD⁺, což by teoreticky mohlo vést k inhibici některých enzymů této metabolické dráhy nebo k syntéze nefunkčních analogů. Nicméně tato domněnka nebyla prokázána¹⁵⁷. Mykobakterie jsou navíc kromě biosyntézy NAD⁺ z nikotinamidu (či nikotinové kyseliny) schopné syntetizovat NAD⁺ *de novo* z aminokyselin¹⁵⁸.

Fosforibosyl transferasa kyseliny chinolinové (QAPRTasa) představuje klíčový enzym v *de novo* syntéze NAD⁺¹⁵⁹. QAPRTasa katalyzuje syntézu mononukleotidu kyseliny nikotinové (NAMN) z kyseliny chinolinové a 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu¹⁵⁹, a již dříve byla studována jako možný cíl nových antituberkulotik¹⁶⁰. V roce 2014 byla publikována studie popisující inhibici katalytické aktivity izolované mykobakteriální QAPRTasy pomocí PZA (analog kyseliny chinolinové)¹⁶¹. Mechanismus účinku je pravděpodobně založen na vazbě PZA do vazebného místa pro chinolinovou kyselinu. V případě POA nebyla zaznamenána žádná inhibiční aktivita¹⁶¹. Na základě výsledků této studie byl identifikován další specifický cíl pro PZA - QAPRTasa.



• Aspartát dekarboxylasa

Aspartát dekarboxylasa (PanD) byla identifikována jakožto možný cíl POA na základě studia kmenů rezistentních na PZA bez mutace genů *pncA* i *rpsA*. U těchto kmenů byla pomocí sekvencování genomu objevena mutace *panD*¹². PanD se podílí na syntéze β-alaninu, který je prekurzorem pro panthotenát a syntézu CoA¹². Shi et al.¹⁶² v roce 2014 publikoval studii, ve které popsal příčinnou souvislost mezi mutací genu *panD* a rezistencí na POA u kmenů bez mutace *pncA*

a *rpsA*. Popsána byla též inhibice mykobakteriální PanD pomocí POA (v terapeuticky relevantních koncentracích 25 – 200 µg/ml), nicméně tento enzym nebyl inhibován ani PZA, ani nikotinamidem¹⁶². Na základě těchto výsledků byla PanD navržena jako nový specifický cíl pro POA.

3.4.2 Mechanismus rezistence na PZA

V roce 1996 byla prokázána spojitost mezi genem *pncA* kódujícího enzym nikotinamidasu/pyrazinamidasu a rezistencí *Mycobacterium tuberculosis* na PZA¹⁶³. Následně bylo zjištěno, že mutace genu *pncA* představuje hlavní mechanismus rezistence na PZA (přibližně u 72 – 97 % kmenů *Mycobacterium tuberculosis*)^{11; 164; 165}. Mimo konverze PZA na POA je pro nespecifický mechanismus účinku důležitý určitý poměr mezi efluxem POA do extracelulárního prostoru a přestupem HPOA zpět do intracelulárního prostoru¹⁴². Jak bylo zjištěno, účinnost efluxního systému je variabilní, nicméně u kmenů *Mycobacterium tuberculosis* citlivých na PZA se nachází v určitém rozmezí. Izolované kmeny *Mycobacterium tuberculosis* s hodnotami efluxu POA nižšími než toto rozmezí byly rezistentní na PZA¹⁶⁶. Na druhou stranu, u kmenů přirozeně rezistentních na PZA (například *Mycobacterium smegmatis*) byly pozorovány hodnoty efluxu až 900krát vyšší než u *Mycobacterium tuberculosis*¹⁶⁶.

S objevem nového specifického cíle pro POA (protein RpsA), byla posléze objevena i mutace genu *rpsA* (*Rv1630*) kódujícího tento protein. V důsledku mutace dochází ke změně vazebného místa pro POA na C-konci proteinu a tím k zprostředkované rezistenci na PZA^{11; 154}.

Dále byly izolovány kmeny rezistentní na PZA bez mutace genů *pncA* i *rpsA*^{11; 12}. Pomocí sekvencování genomu byl jako cíl mutace stanoven gen *panD*, které kóduje PanD. Mezi identifikované mutace u PZA-resistentních kmenů patří také mutace genu *hadC* kódující β-hydroxyacyl-ACP dehydratasu zapojenou do elongace mykolových kyselin^{12; 167}. Tato mutace vede primárně ke ztrátě virulence mykobakterií¹⁶⁷, tudíž se nepředpokládá, že by měla přímou spojitost s rozvojem PZA-rezistence¹².

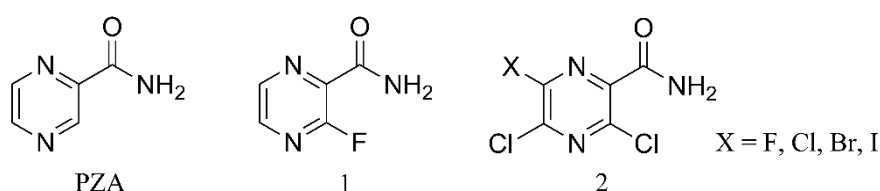
3.4.3 Deriváty pyrazinamidu s antimykobakteriální aktivitou

Tato kapitola bude věnována derivátům připraveným chemickou obměnou molekuly PZA či POA, u kterých byla hodnocena antimykobakteriální aktivita a byly publikovány od roku 2011. Předchozí období, tj. látky publikované do roku 2010 včetně, ve své disertační práci detailně popsal doktor Zitko¹⁶⁸. Pomineme-li deriváty připravené pracovní skupinou prof. Doležala na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (bude diskutováno v jiné části této disertační práce, kapitoly

5.1 a 5.2), bylo od roku 2011 publikováno jen malé množství sloučenin, které ve srovnání s PZA vykazují vyšší antimykobakteriální aktivitu.

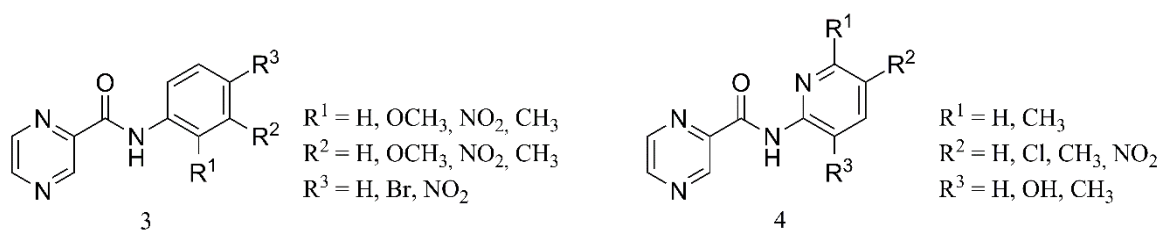
Jednoduché substituce pyrazinového jádra

Během posledních 5 let byly publikovány jednoduché deriváty PZA vzniklé zavedením halogenu/halogenů na pyrazinové jádro. Zavedení fluoru do polohy 3 (**1**) nevedlo k výraznému zvýšení *in vitro* antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 12,5 µg/ml)¹⁶⁹ v porovnání s PZA (běžně udávané hodnoty MIC = 12,5 – 25 µg/ml)¹⁷⁰. Dále byla připravena série 6-halogen derivátů odvozených od 3,5-dichlorpyrazin-2-karboxamidů (**2**), z nichž nevyšší aktivitu i vůči MDR kmenu *Mycobacterium tuberculosis* vykázaly deriváty substituované v poloze 6 jódem¹⁷¹.

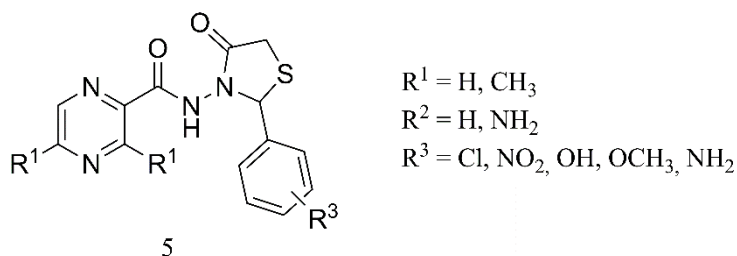


Substituce karboxamidové funkce

V roce 2012 byla publikována série 17 anilidů kyseliny pyrazinkarboxylové monosubstituovaných na fenylovém jádře (**3**), nicméně pouze 9 sloučenin nemělo dříve popsanou *in vitro* antimykobakteriální aktivitu¹⁷². Žádný z těchto derivátů nevykázal antimykobakteriální aktivitu (MIC > 100 µg/ml). V témže roce byla publikována i série na pyridinovém jádře substituovaných *N*-pyridin-2-yl-pyrazin-2-karboxamidů (**4**). Pouze *N*-(4-chlorpyridin-2-yl)pyrazin-2-karboxamid vykázal aktivitu srovnatelnou s PZA (MIC = 6.25 µg/ml)¹⁷³.



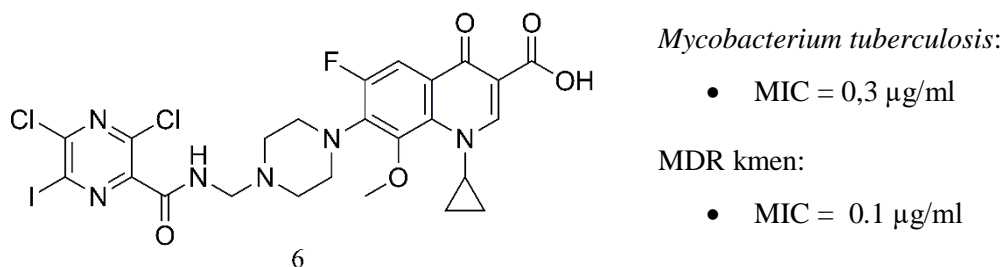
23 sloučenin obecné struktury (**5**) bylo připraveno reakcí hydrazidu POA se substituovanými benzaldehydy a následnou kondenzací vzniklého hydrazonu s kyselinou thioglykolovou¹⁷⁴. Hodnoty MIC vůči nereplikujícím se kmenům *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra a *M. bovis* BCG se pohybovaly v rozmezí od 25 – 30 µg/ml pro *M. tuberculosis* a 8 – 30 µg/ml, pro *M. bovis*. Na základě dockingových studií autoři předpokládají, že by možným cílem těchto derivátů mohl být podobně jako v případě benzothiazinonů¹⁰⁴ enzym dekaprenylfosforyl-β-D-riboza-2'-epimerasa.



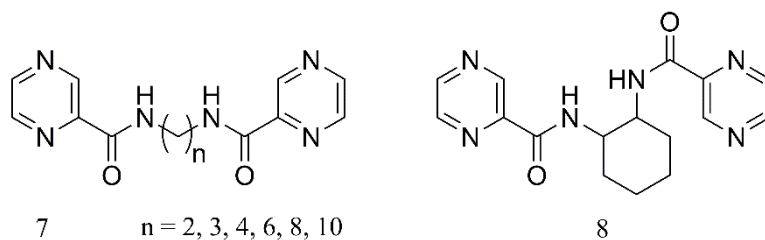
Hybridní molekuly

Jednou z možných modifikací struktury je příprava hybridních molekul (označovaných též jako zdvojené molekuly, v anglické literatuře pak jako codrugs nebo mutual prodrugs), které vznikají spojením dvou farmakologicky účinných látek, často se synergických efektem¹⁷⁵. U těchto látek se předpokládá zvýšení biodostupnosti a stability, zesílení terapeutického efektu či snížení nežádoucích účinků¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

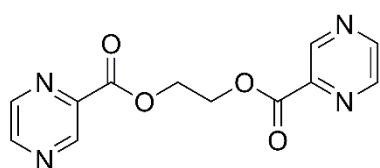
Modifikací karboxamidové skupiny 3,5-dichlor-6-jodpyrazin-2-karboxamidu byly připraveny deriváty s vynikající antimykobakteriální aktivitou i vůči MDR kmenu *Mycobacterium tuberculosis*¹⁷¹. Nejslibnější aktivitu vykázal derivát (6), ve kterém je na PZA fragment methylenovým můstkem vázána molekula strukturně blízká gatifloxacinu. Vyšší aktivita ve srovnání s PZA může být tedy vysvětlena štěpením amidové vazby a uvolněním dvou aktivních molekul.



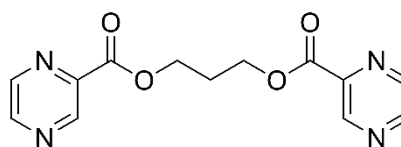
Reakcí methylesteru kyseliny pyrazinkarboxylové s diaminy byla připravena série derivátů obsahujících dva pyrazinamidové fragmenty propojené různě dlouhým alkylenovým řetězcem (7) případně cyklohexanem (8)¹⁷². Aktivitu těchto derivátů se nicméně nepodařilo stanovit z důvodu špatné rozpustnosti látek v testovacím médiu.



POA je *in vivo* neúčinná a to kvůli nevýhodným farmakokinetickým vlastnostem, které byly alespoň z části odstraněny přípravou lipofilnějších esterů s krátkým alkylovým řetězcem^{178; 179}. Nicméně hlavním problémem esterů zůstává nedostatečná stabilita v plazmě. Proto byly připraveny estery odvozené od terciárních alkoholů, u nichž dochází k sterickému chránění esterové vazby a zpomalení hydrolýzy¹⁸⁰. Zvýšení stability v plazmě bylo pozorováno i u esterů s dlouhým alkylovým řetězcem (například u dodecylpyrazinoátu)¹⁸¹. Přípravou derivátů s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi se zabývali i Segretti et al.¹⁸², nicméně zdvojení molekuly POA, kdy jednotlivé fragmenty jsou vzájemně propojeny ethylenovým (**9**) a propylenovým (**10**) můstkem nevedlo k dalšímu zvýšení aktivity oproti jednoduchým esterům POA s krátkým alkylovým řetězcem. Dle autorů by k dalšímu zvýšení aktivity mohlo dojít prodloužením spojovacího alkylenového řetězce.

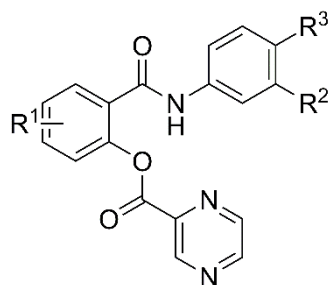


9



10

Krátký et al.¹⁸³⁻¹⁸⁵ publikovali sérii derivátů vzniklých spojením antimykobakteriálně účinných salicylanilidů a POA (**11**). *In vitro* aktivita těchto látek vůči *Mycobacterium tuberculosis* se pohybovala v rozmezí MIC 0,5 – 8 $\mu\text{mol/l}$ a 1 – 32 $\mu\text{mol/l}$ vůči *M. avium* a *M. kansasii*. Nejúčinnější deriváty navíc vykazovaly slibnou aktivitu i vůči MDR kmenům *M. tuberculosis* (MIC 0,125 – 2 $\mu\text{mol/l}$). Nárůst antimykobakteriální aktivity autoři přisuzují aditivnímu či synergickému efektu POA a salicylanilidu uvolněných po hydrolýze esterové vazby¹⁸³. U těchto derivátů byla navíc pozorována aktivita vůči Gram-pozitivním bakteriím včetně MRSA v řádu jednotek či desetin $\mu\text{mol/l}$ ¹⁸⁵ a částečná inhibice izolované isocitrát lyasy¹⁸³, tj. enzymu nezbytného pro metabolismus mastných kyselin a faktorů virulence¹⁸⁶.

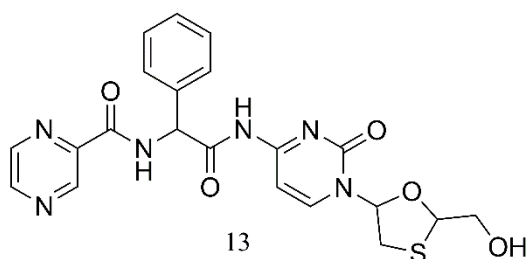
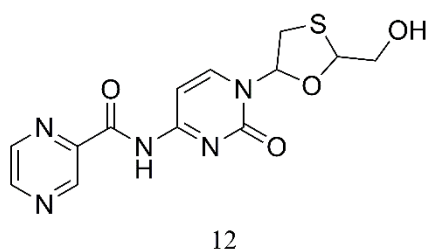


11

$R^1 = \text{H, Cl}$
 $R^2 = \text{H, Cl, Br, F, CF}_3$
 $R^3 = \text{H, Cl, Br, F, CF}_3$

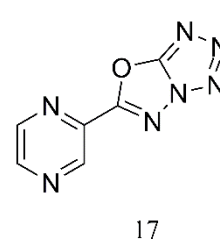
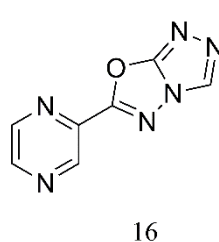
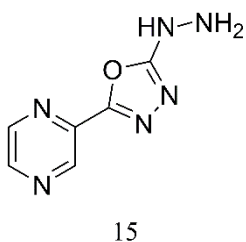
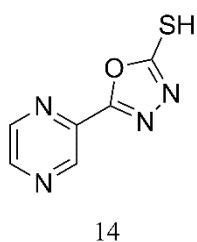
Mimo kombinace sloučenin se známou antimykobakteriální aktivitou byly připraveny deriváty (**12**, **13**) kombinující antivirotikum lamivudin a POA¹⁸⁷. Nicméně u těchto derivátů nebyl

pozorován výrazný nárůst aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 5 µg/ml) a autoři publikace se dále nezabývali stabilitou těchto látek. Na základě velikosti finální molekuly je velice nepravděpodobné, že by docházelo ke štěpení amidové vazby působením mykobakteriální PncA. Kavita, do které se váže PZA či substrát, je poměrně malá (velikost 10 Å × 7 Å). Štěpený substrát musí být správně orientován do katalytického místa, které se nachází na dně kavity a je tvořeno zbytky třech aminokyselin – lysin 96 (Lys96), kyselina asparagová 8 (Asp8) a cystein 138 (Cys138)¹⁸⁸. Amidová vazba bude navíc stabilizovaná konjugací volného elektronového páru amidového dusíku s aromatickým jádrem. Z tohoto pohledu se zdá být kombinace lamivudinu a PZA nevýhodná.



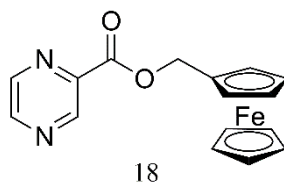
Obměny karboxamidové funkce

1,3,4-Oxadiazoly a 1,2,4-oxadiazoly bývají s výhodou využívány jako bioisostery amidové a esterové skupiny¹⁸⁹. V roce 2015 publikovali Das et al.¹⁹⁰ deriváty, ve kterých byla amidová skupina PZA součástí heterocyklu a to 1,3,4-oxadiazolu (**14**, **15**), 1,3,4-oxadiazolo[2,3-*b*]-1,3,5-triazolu (**16**) a 1,3,4-oxadiazolo[2,3-*b*]-1,3,4,5-tetrazolu (**17**). Z těchto látek se jako neslibnější jevil derivát **14** (MIC = 6,25 µg/ml).

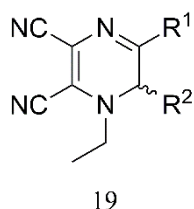


Jiné deriváty PZA a POA

V minulých letech byl popsán nárůst biologické aktivity (např. antimalarické¹⁹¹ a antibakteriální¹⁹²) u sloučenin připravených zavedením ferrocenu do molekuly léčiva. Nicméně v případě derivátů odvozených od ethambutolu nebylo pozorováno zvýšení antimykobakteriální aktivity¹⁹³. Esterifikací POA ferrocenylmethanolem byl připravený ferrocenylmethylpyrazinoát (**18**), jehož aktivita byla prakticky srovnatelná s PZA¹⁹⁴.

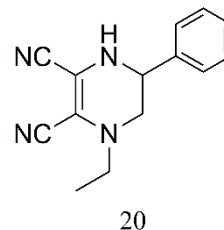


Verbitskiy et al.¹⁹⁵ připravili s využitím Petasisovy reakce sérii 1-alkyl-1,6-dihydropyrazinových derivátů substituovaných v poloze 5 a 6 aromatickým nebo heteroaromatickým jádrem (**19**). Některé z těchto derivátů vykazaly slibnou aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, *M. terrae* i MDR a XDR kmenům (MIC = 0,3 – 3,1 µg/ml, *R* i *S* isomery), další látky ze série měly aktivitu srovnatelnou s PZA. V následující sérii bylo heteroaromatické jádro v poloze 6 nahrazeno styrylovou skupinou, což vedlo ke snížení antimykobakteriální aktivity¹⁹⁶. Při syntéze 5-substituovaných 1-alkyl-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilů byly jako vedlejší produkt izolovány odpovídající 1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrily. Pouze jeden derivát a to 1-ethyl-5-fenyl-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril (**20**) vykázal aktivitu vůči všem testovaným mykobakteriálním kmenům (MIC = 0,7 – 1,5 µg/ml, testováno jako racemát) a slibnou *in vivo* toxicitu (myší model, LD₅₀ = 600 mg/kg)¹⁹⁶. Otázkou však zůstává vlastní mechanismus účinku těchto látek.



R¹
fenyl
thiofen-2-yl
thiofen-3-yl

R²
thiofen-2-yl
thiofen-3-yl
benzo[b]thiofen-2-yl
benzo[b]thiofen-3-yl
furan-2-yl



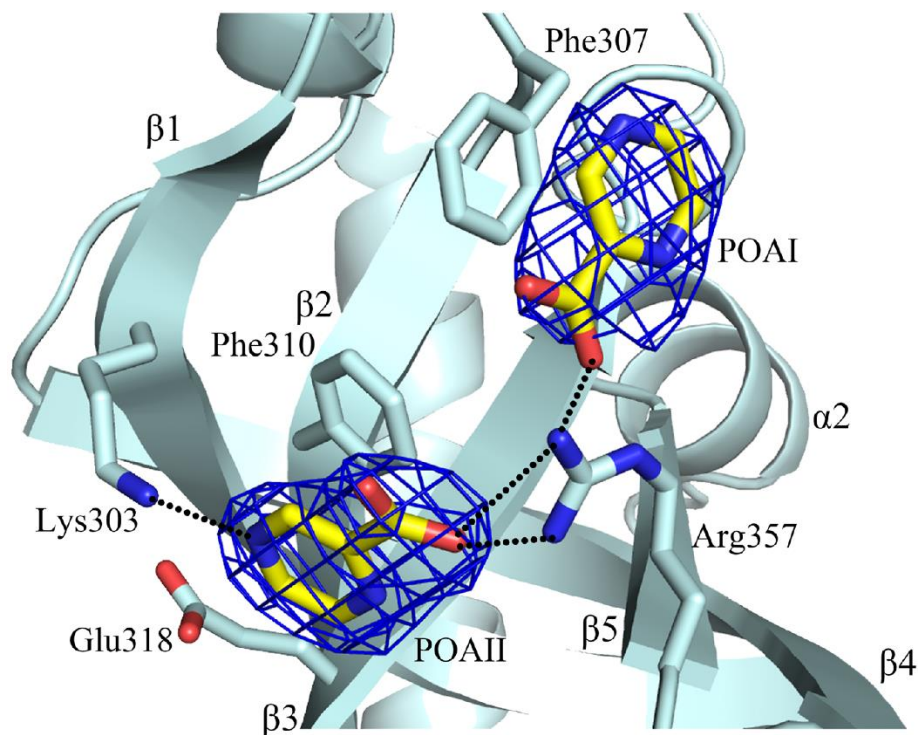
3.4.4 Ribosomální protein S1 - krystalografická struktura a možné obměny pyrazinového jádra

V lednu 2015 byla publikována krystalografická struktura RpsA a popsáno vazebné místo pro POA¹⁵⁴. Na základě strukturní analýzy bylo určeno, že se POA váže na C-konec tohoto proteinu a to tvorbou vodíkových můstků a pomocí hydrofobních interakcí, které vznikají především mezi zbytky aminokyselin – fenylalaninu 307 a 310 (Phe307 a Phe310) a argininu (Arg357)^{154; 197}. Tyto aminokyseliny jsou nezbytné pro vazbu tmRNA na ribozom. POA je vázána do C-konce dvěma možnými způsoby. V prvním případě (POAI) vytváří pyrazinové jádro π - π interakce s Phe307 a karboxylát tvoří vodíkové můstky s guanidinovým zbytkem Arg357. V druhém případě (POAII) vytváří pyrazinové jádro π - π interakce s Phe310 a karboxylát vodíkové můstky opět s guanidinovým zbytkem Arg357, viz **Obrázek 7**. V případě POAII navíc dochází k tvorbě

vodíkového můstku mezi N4 a Lys303, a dále k hydrofobním interakcím mezi C5 a C6 pyrazinového jádra a glutamovou kyselinou 318 (Glu318). Vazbou POA dochází k významným konformačním změnám RpsA. Na rozdíl od POA se PZA neváže na RpsA, což se s největší pravděpodobností dáno chybějícím vodíkovým můstkem mezi Arg357 a PZA (amidický atom dusíku nevytváří vodíkový můstek s guanidinovým zbytkem Arg357)¹⁵⁴.

C5 a C6 pyrazinového jádra nehrají zásadní roli na vazbě POA do RpsA a z tohoto důvodu by se mohly stát místem dalších modifikací struktury POA. Jako výhodná se zdá být substituce alkylovým řetězcem, která by v důsledku zvýšení lipofility usnadnila penetraci POA mykobakteriální buněčnou stěnou, což by bylo obzvláště výhodné u kmenů rezistentních na PZA z důvodů mutace *pncA*.

Obrázek 7: Interakce mezi vazebným místem RpsA a POAI/POAII.



Vodíkové vazby mezi karboxylátem POA a guanidinovým zbytkem Arg357 jsou znázorněny tečkovaně, elektronová hustota je znázorněna jako modrá síť obalující POA. Převzato z Yang et al.¹⁵⁴.

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Přístroje, chemikálie a použité analytické metody

Výchozí látky byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (Schnelldorf, Německo). Průběh reakce byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) s využitím desek Silica gel F₂₅₄, Merck (Darmstadt, Německo). Jako vyvíjecí soustava byla použita směs hexanu s ethylacetátem v různých poměrech. Detekce byla prováděna pod UV lampou s vlnovou délkou záření 254 nm.

Část látek byla syntetizována s využitím mikrovlnného reaktoru CEM Discover s autosamplerem Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA). Pro nastavení podmínek, kontrolu průběhu reakcí a záznam procesu byl použit software CEM's SynergyTM.

Finální produkty byly separovány gradientovou elucí (hexan – ethylacetát) pomocí preparativního chromatografu CombiFlash® R_f (Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA) s použitím kolon plněných silikagelem o velikosti částic 0,040 – 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Při separaci byla používána UV detekce, nastaveny byly dvě vlnové délky a to 260 nm jako detekční a 280 nm jako monitorovací vlnová délka. V případě potřeby byly látky přečištěny krystalizací z ethanolu s přidavkem aktivního uhlí. Teplota tání čistého produktu byla stanovena v otevřené kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP30 (Bibby Sterling Limited, Staffordshire, UK), výsledné hodnoty jsou nekorigované.

Infračervená spektra připravených sloučenin byla měřena v KBr tabletě nebo získána metodou zeslabené totální reflektance (ATR) na Ge krystalu na přístroji Nicolet Impact 6700 FT-IR (Nicolet, Madison, WI, USA) na Katedře anorganické a organické chemie (paní Iva Vencovská).

¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra byla změřena také na Katedře anorganické a organické chemie (doc. PharmDr. Jirí Kuneš, CSc.) a to pomocí spektrometru Varian Mercury VX-BB 300 a Varian VNMR S500 (Varian Corp., Palo Alto, California, USA). Spektra byla změřena v deuterovaném chloroformu, dimethylsulfoxidu (DMSO) nebo acetonu při laboratorní teplotě a frekvenci 300 MHz pro ¹H a 75 MHz pro ¹³C, respektive 500 MHz pro ¹H a 125 MHz pro ¹³C. Chemické posuny byly zaznamenány jako hodnoty δ v jednotkách ppm a jsou nepřímou vztaženy k tetramethylsilanu.

Elementární analýzy byly provedeny pomocí analyzátoru CE Instruments EA-1110 CHN (CE Instruments, Wigan, UK) a Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (paní Věnceslava Hronová).

Hmotnostní spektra části finálních produktů byla změřena na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv (doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.) v roztoku obsahujícím methanol, vodu a mravenčí kyselinu v poměru 80:20:0.02 v/v za použití LCQ Advantage Max ion-trap hmotnostního spektrometru (Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) při pozitivní ionizaci elektrosprejem.

Retenční faktor k byl změřen pomocí kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 SL s detektorem diodového pole SL G1315C (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, Colorado, USA) na Katedře biofyziky a fyzikální chemie (Ing. Vladimír Kubíček, CSc.) a využit pro přepočítání na $\log k$ (parametr lipofility). Separační proces byl kontrolován pomocí Agilent ChemStation, verze B.04.02 rozšířeným o spektrální modul (Agilent Technologies Inc.). Log P a Clog P sloučenin byly vypočteny pomocí programu CS ChemBioOffice Ultra, verze 12.0 a 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, Massachusetts, USA).

4.2 Použité syntetické postupy

Po chemické stránce práce navazuje na kvalifikační práce dříve obhájené na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv^{168; 198; 199}. Při syntéze meziproductů²⁰⁰⁻²⁰⁷ a finálních sloučenin^{205; 208} uvedených v této disertační práci byly použity metody dříve popsané v literatuře. Konkrétní reakční podmínky stejně jako výtěžky reakcí jsou uvedeny v jednotlivých přílohách a zmíněny v komentářích dosažených výsledků.

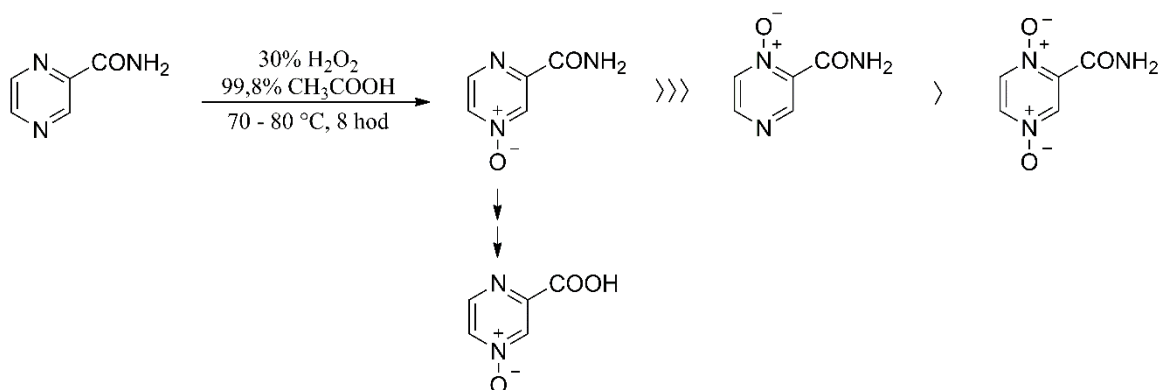
Syntéza části sloučenin byla urychlena použitím mikrovlnného reaktoru, bližší popis včetně reakčních podmínek bude uveden v kapitole 5.2.2.

***N*-oxidace**

Pyrazinové jádro mnohem lépe podléhá nukleofilním substitucím spíše než elektrofilním substitucím, obzvláště je-li aktivováno převedením na *N*-oxidy. Směs *N*-oxidů POA byla připravena reakcí PZA s ledovou kyselinou octovou a 30% peroxidem vodíku ve vodě^{200; 201} a následnou hydrolyzou karboxamidu. Celková doba zahřívání (8 hod), teplota (70–80 °C) a molární koncentrace peroxidu vodíku ovlivňují poměr jednotlivých *N*-oxidů ve směsi.

Nicméně z důvodu nízkých výtěžků byl tento postup nahrazen přímou oxidací POA působením peroxidu vodíku s použitím wolframanu sodného (katalyzátor). Po okyselení (H₂SO₄, pH = 2) byla reakce zahřívána po dobu 2 hod na 80 °C a poté míchána při laboratorní teplotě po dobu 12 hod. Při této reakci preferenčně vznikal 4-oxid POA (výtěžek reakce 75 %)²⁰².

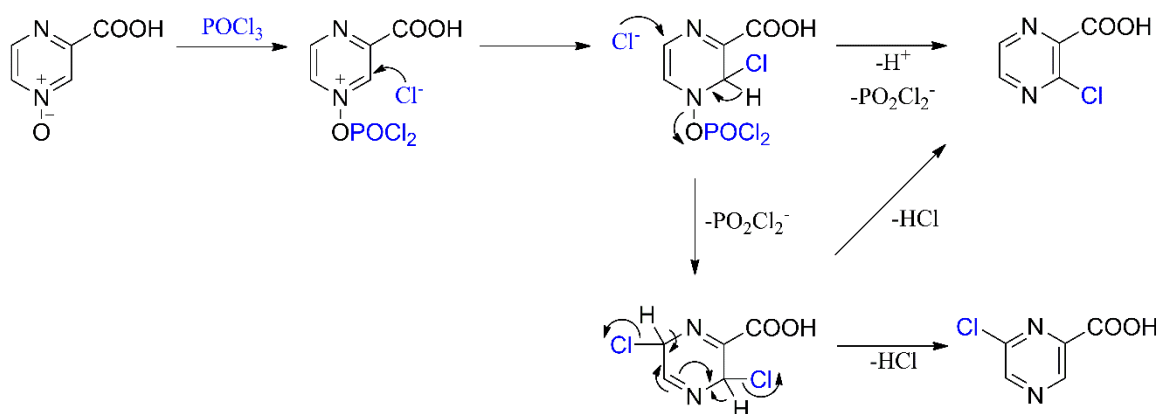
Schéma 2: Příprava 1-oxidu, 4-oxidu a 1,4-dioxidu PZA.



Alkylace a chlorace pyrazinového jádra

Halogenderiváty pyrazinu lze připravit přímou halogenací (nukleofilní substitucí) odpovídajících *N*-oxidů, přičemž výsledná poloha halogenace na jádře substituovaných 4-oxidů závisí na charakteru substituentu²⁰⁷. V případě substituentů s -M efektem (-COOH, -CONH₂, -CN) probíhá přednostně halogenace do polohy 6, kdežto u substituentů s +M (-F, -Cl, -NH₂, -OH) do polohy 3²⁰⁷. 6-Chlorpyrazin-2-karboxylová kyselina byla připravena přímou chlorací 4-oxidu POA za současné deoxidace působením chloridu fosforu.

Schéma 3: Pravděpodobný mechanismus chlorace 4-oxidu POA.

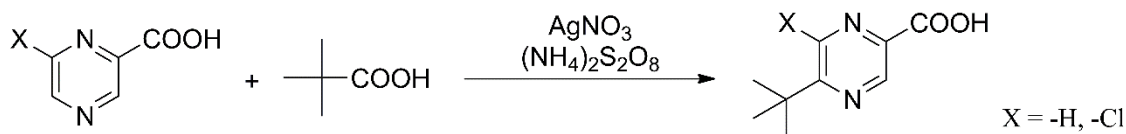


Přednostně dochází k chloraci v poloze 6, převzato z Palek¹⁹⁹.

Alkylovou skupinu na pyrazinové jádro lze zavést radikálovou alkylací (homolytická alkylace) s použitím odpovídající alkanové kyseliny, ze které vznikají v přítomnosti dusičnanu stříbrného a peroxodisíranu amonného alkyldradikály (Minisciho reakce)²⁰⁹.

Výchozí látky, tj. kyselina 5-*tert*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylová a 5-*tert*-butylpyrazin-2-karboxylová byly připraveny homolytickou alkylací kyseliny 6-chlorpyrazin-2-karboxylové respektive POA kyselinou pivalovou²⁰⁵, viz **Schéma 4**.

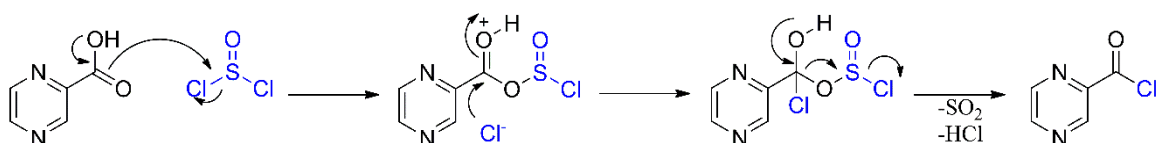
Schéma 4: Alkylace odpovídající POA kyselinou pivalovou v prostředí dusičnanu stříbrného a peroxidisíranu amonného.



Příprava funkčních derivátů POA – acylchloridy a amidy

Acylchloridy jednotlivých POA byly připraveny reakcí s chloridem thionylu (SOCl_2)²⁰⁶. Po odstranění přebytku SOCl_2 byl surový chlorid POA použit do další reakce s odpovídajícími aminy za vzniku příslušných amidů²⁰⁵ (*N*-fenylparazin-2-karboxamidy a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy).

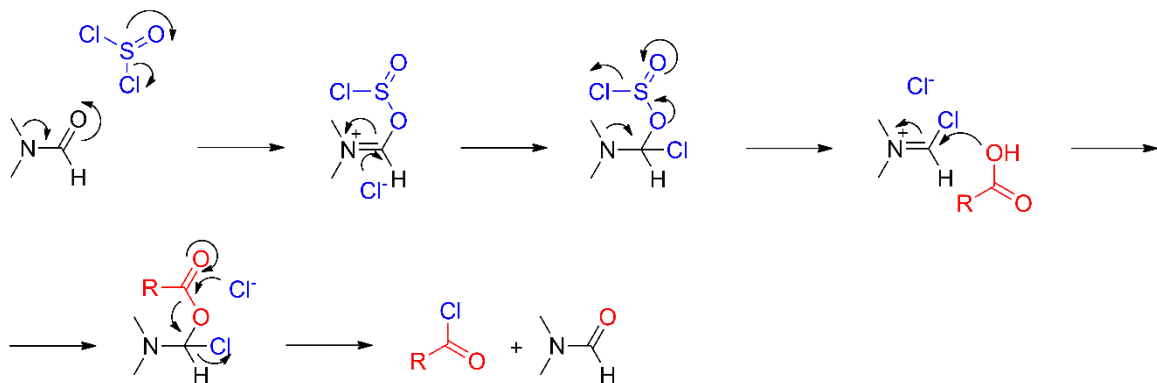
Schéma 5: Syntéza chloridu kyseliny pyrazin-2-karboxylové reakcí s chloridem thionylu.



Převzato a upraveno z Clayden et al.²¹⁰.

V případě syntézy chloridu kyseliny 5-chlorpyrazin-2-karboxylové byla jako výchozí látka použita kyselina 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová. Reakcí s SOCl_2 katalyzované *N,N*-dimethylformamidem (DMF) dochází kromě vzniku chloridu kyseliny také k záměně hydroxyly chlorem^{204; 210}. Nejdříve dochází k reakci DMF s SOCl_2 za vzniku reaktivního intermediátu, který následně reaguje s karboxylovou skupinou. Při reakci se uvolňuje oxid siřičitý a chlorovodík, DMF regeneruje.

Schéma 6: Obecné schéma syntézy acylchloridu za katalýzy DMF.



Převzato z Clayden et al.²¹⁰.

Substituční reakce chlorderivátů pyrazinu – aminodehalogenační reakce

Aminodehalogenační reakce na pyrazinovém jádře (usnadněna přítomností elektronegativních funkčních skupin, např. $-\text{CONH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$)^{211; 212} patří mezi chemické reakce hojně využívané kolektivem prof. Doležala^{213; 214}. V průběhu vlastní reakce dochází k uvolnění HCl, který je vhodné eliminovat nadbytkem aminu nebo přidavkem báze například triethylaminu (TEA) do reakce. V této práci jsou uvedeny deriváty vzniklé náhradou chloru za aminoskupinu primárních alifatických aminů, fenylalkylaminů a cykloalkylaminů.

4.3 Docking

Dockingové studie byly provedeny ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie, Farmaceutické fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě s použitím modelovacího softwaru od společnosti Schrödinger (Schrödinger, Inc., Portland, Oregon, USA), respektive AutoDock Tools 1.5.6. a AutoDock Vina (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA), a výslednou vizualizací v programu Maestro verze 9.3.5 a 9.8 (Schrödinger, Inc., Portland, Oregon, USA). Krystalografické struktury cílových enzymů PncA (PDB: 3PL1) a InhA (PDB: 2X23) byly získány z databáze PDB (Protein data bank; RCSB PDB, Rutgers The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, USA). Vybrané aktivní sloučeniny byly studovány jako možný substrát pro PncA (5- a 6-alkylaminopyrazin-2-karboxamidy a 6-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy). V další fázi následovala studie zabývající se inhibicí InhA, kdy na základě strukturní podobnosti se známými inhibitory InhA odvozenými od triklosanu byla vybrána série alkylamino derivátů *N*-benzylpyrazin-2 karboxamidu. Přesný popis postupů a jednotlivých programů použitých při modelování je uveden v přílohách **P4** – **P6**, výsledky dockingu budou diskutovány v kapitole 5.2.

4.4 Metodiky biologického hodnocení

4.4.1 Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Testování antimykobakteriální aktivity bylo prováděno ve spolupráci s Ústavem klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, a to mikrodiluční metodou na mikrotitračních destičkách s vizuálním odečtem. Kmeny byly zakoupeny z České národní sbírky typových kultur (CNCTC²¹⁵) Státního zdravotního ústavu. Konkrétně se jednalo o tyto kmeny: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 a *M. kansasii* CNCTC My 235/80. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO, naředěny v zásobních zkumavkách na koncentrace 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 – 1,563 µg/ml přidáním kultivační půdy (Šulova půda, Trios, Praha) a poté napipetovány do jamek

mikrotitračních destiček. Finální koncentrace DMSO (do 1%) neměla vliv na růst mykobakterií. Základní suspenze mykobakterií (hustota suspenze 0,5 – 1,0 dle McFarlandovy zákalové stupnice) byla upravena přidáním izotonického roztoku na koncentrace 10^{-1} a 10^{-3} CFU/ml, kterými byly následně inokulovány jamky mikrotitračních destiček. Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací (MIC) pro ředění 10^{-1} a 10^{-3} CFU/ml se nesměly lišit o více než jeden řád, v opačném případě nebyl výsledek testování platný. Destičky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu obvykle nepřesahující 10 – 14 dnů. pH Šulovy půdy bylo pravidelně kontrolováno a nejčastěji bylo v rozmezí pH = 5,5 – 6,0. Při posunu pH k vyšším hodnotám bylo pozorováno snížení účinnosti PZA vůči *M. tuberculosis*. Pro kontrola viability kmene byl použit DMSO (viditelný nárůst mykobakterií v kontrolních jamkách) a jako standardy PZA pro *M. tuberculosis* a INH pro ostatní testované kmeny. MIC ($\mu\text{g/ml}$) byly odečteny vizuálně jako nejnižší testovaná koncentrace, která vede k viditelnému potlačení růstu mykobakterií.

Toto testování bylo nahrazeno tzv. Microplate Alamar Blue Assay (MABA²¹⁶), které využívá k vizualizaci živých mykobakterií barvivo Alamar blueTM neboli resazurin. Jedná se o ve vodě rozpustné redoxní barvivo stabilní v kultivačních médiích, které snadno prochází buněčnými membránami²¹⁷. Původně bylo používáno k stanovení bakterií v mléce²¹⁸, posléze se jeho využití rozšířilo například na sledování dějů jako je buněčná proliferace^{219; 220}, dále je využíváno k testování cytotoxicity²²⁰⁻²²², a ke stanovení citlivosti bakterií na antimikrobiální látky^{223; 224}. V živých buňkách je resazurin redukován různými redoxními systémy, jako jsou například NADPH, NADH a cytochromy^{221; 225}. V oxidované formě má resazurin modrou barvu (bez fluorescence), kdežto jeho redukováná forma resorufin má růžovou barvu a vykazuje silnou fluorescenci^{217; 226}. Změna barvy a fluorescence indikuje přítomnost živých buněk a jejich viabilitu. Hlavní výhodou této metody oproti dříve používané je přesnější a dřívější (3 – 5 dní) odečet výsledků (kvalitativní hodnocení změny barvy, případně kvantitativně – detekce fluorescence či spektrofotometricky).

Ve spolupráci s Centrem klinických laboratoří při Zdravotním ústavu v Ostravě byly vybrané látky testovány na MDR kmenech (klinické izoláty, *Mycobacterium tuberculosis* Praha 1, Praha 4, Praha 131, 234/2005, 9449/2007, 7357/1998 a 8666/2010) pomocí mikrodiluční metody na mikrotitračních destičkách s vizuálním odečtem. Látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny Šulovou půdou (Trios, Praha) na finální koncentrace od 1 do 1000 $\mu\text{mol/l}$. Jako standard byl použitý INH a to v koncentracích od 0,5 do 250 $\mu\text{mol/l}$. MIC byla odečítána jako nejnižší testovaná koncentrace, která vede k viditelnému potlačení růstu mykobakterií po 14 a 21 dnech inkubace (37 °C).

4.4.2 Hodnocení antifungální aktivity

Ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové byla hodnocena antifungální aktivita připravených látek s využitím mikrodiluční bujónové metody²²⁷. Mezi testované kmeny patřily: *Candida albicans* ATCC 44859 (**CA**), *Candida tropicalis* 156 (**CT**), *Candida krusei* E28 (**CK**), *Candida glabrata* 20/I (**CG**), *Trichosporon asahii* 1188 (dříve beigelii, **TB**), *Aspergillus fumigatus* 231 (**AF**), *Lichtheimia corymbifera* 272 (dříve *Absidia corymbifera*, **AC**) a *Trichophyton mentagrophytes* 445 (**TM**). Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny v RPMI 1640 médiu s glutaminem. Koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřesahovala 2,5 % (v/v) celkového složení roztoku. V těchto koncentracích neovlivňuje DMSO růst testovaných kmenů, což bylo ověřeno v kontrolních jamkách. Vlastní inkubace byla prováděna v humidní atmosféře za tmy v RPMI 1640 médiu s glutaminem pufovaným na pH = 7,0 (pomocí MOPS = 3-morfolinpropan-1-sulfonové kyseliny) a při teplotě 35 °C. MIC byly odečítány vizuálně po 24 a 48 hodinách od začátku inkubace, respektive po 72 a 120 hodinách pro kmen *Trichophyton mentagrophytes*. Jako standardy byly použity flukonazol (FLU) a amfotericin B (AMB).

4.4.3 Hodnocení antibakteriální aktivity

Antibakteriální aktivita byla testována rovněž na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, a to mikrodiluční bujónovou metodou²²⁸.

Bakteriální kmeny použité pro testování, byly vybrány z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms, **CCM**) Masarykovy univerzity v Brně. Konkrétně byla testována aktivita vůči kmenům: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (**SA**), *Escherichia coli* CCM 4517 (**EC**), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 (**PA**). Další bakteriální kmeny byly klinické izoláty získané z Oddělení klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové: *Staphylococcus aureus* H 5996/08-meticilin resistantní (**MRSA**), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 (**SE**), *Enterococcus* sp. J 14365/08 (**EF**), *Klebsiella pneumoniae* D11750/08 (**KP**), *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL pozitivní (**KP-E**).

Všechny testované kmeny byly kultivovány v Müller-Hintonovu bujónu (MHA) při teplotě 35 °C a následně udržovány na stejném médiu při teplotě 4 °C. Bakteriální suspenze byla připravena přenesením inokula do sterilního isotonického roztoku a hustota suspenze byla následně upravena na 0,5 dle McFarlandovy zákalové stupnice. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO, jehož výsledná koncentrace v testovacím médiu nepřesáhla 1% (v/v) a pomocí kontroly bylo prokázáno, že v těchto koncentracích DMSO neovlivňuje růst bakterií. Kultivace v MHA při pH = 7,0 a teplotě 35 °C. Hodnoty MIC, definované jako 95% inhibice bakteriálního růstu ve srovnání s kontrolním

vzorkem, byly odečítány po 24 a 48 hodinách statické inkubace. Jako standardy byly použity penicilin G (Pen), ciprofloxacin (Cip), neomycin-sulfát (Neom) a bacitracin (Bac).

4.4.4 Hodnocení inhibice syntézy mykolových kyselin a dalších složek mykobakteriální buněčné stěny

Ve spolupráci s Katedrou biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě byla u vybraných látek hodnocena inhibice syntézy mykolových kyselin. Studováno bylo 10 látek, z nichž 5 bylo připraveno autorkou disertační práce. Princip metody je založen na metabolickém značení a následné detekci mastných a mykolových kyselin izolovaných z mykobakterií (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra), které byly kultivovány s testovanou látkou a ¹⁴C-značeným octanem sodným²²⁹. Mastné a mykolové kyseliny s inkorporovanou radioaktivní značkou byly po extrakci methylovány přidavkem methyljodidu na odpovídající methylestery mastných kyselin (FAME) a methylestery mykolových kyselin (MAME), separovány pomocí TLC a vizualizovány autoradiograficky. Jako standard byl použit inhibitor InhA INH a v případě kontroly byly mykobakterie kultivovány pouze v médiu s radioaktivní značkou. Blíže je metodika popsána v příloze **P6**.

Kromě MAME a FAME byl sledován i vliv testovaných látek na syntézu dalších složek mykobakteriální buněčné stěny, a to PIMs, TMM a TDM. Kultivace a značení mykobakterií probíhalo obdobně jako v případě stanovení mykolových a mastných kyselin, nicméně izolace těchto složek a jejich následná separace se lišila a to především v použitých rozpouštědlech. Detailní popis metody je uveden v příloze **P7** – nepublikovaná data.

4.4.5 Jiné *in vitro* metody

Hodnocení antivirové aktivity

Hodnocení antivirové aktivity probíhalo ve spolupráci s prof. Lieve Naesens (Laboratoř virologie a chemoterapie, Rega institut, Katolická univerzita v Lovani) dle standardních metod pro stanovení redukce cytopatického efektu²³⁰⁻²³². Mezi testované viry patřily: Herpes simplex virus typ 1 (**HSV-1**), Herpes simplex virus typ 1 rezistentní na aciclovir (**HSV-1 KOS**), Herpes simplex virus typ 2 (**HSV-2**), Varicella zoster, lidský adenovirus typ 2, virus vezikulární stomatitidy (**VSV**), Cocksackie virus skupina B4, respirační syncytiální virus (**RSV**), Parainfluenza virus typ 3, Sindbis virus, Punta Toro virus, viry chřipky A/H1N1 a A/H3N2, HIV typ 1 a typ 2. Antivirová aktivita byla odečítána mikroskopicky a vyjádřena jako EC₅₀, tj. koncentrace látky, která vede k poklesu cytopatického efektu viru u 50 % buněk ve srovnání s kontrolou. Blíže jsou jednotlivé metodiky popsány v přílohách **P6**.

Hodnocení *in vitro* cytotoxicity

Hepatotoxicita byla měřena ve spolupráci s Katedrou farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Pokles viability HepG2 buněk stanoven kolorimetricky (redukce tetrazoliových solí) s využitím standardního protokolu^{233; 234}. Výsledky byly vyjádřeny pomocí IC_{50} , tj. koncentrace potřebné k inhibici růstu u 50 % buněk ve srovnání s kontrolou.

Současně s hodnocením antivirové aktivity probíhalo i hodnocení cytotoxicity na testovaných buněčných liniích (CrFK, HEL fibroblasty, HeLa a Vero)²³⁰⁻²³². Cytotoxicita látek na dané buněčné linie byla hodnocena mikroskopicky nebo vizuálně (hodnocení viability buněk s využitím formarzanu)^{231; 232} a vyjádřena jako CC_{50} , tj. koncentrace, která působí cytotoxicky na 50 % buněk ve srovnání s kontrolou. Blíže jsou jednotlivé metodiky popsány v přílohách **P5** a **P6**.

Hodnocení herbicidní aktivity

Ve spolupráci s Chemickým ústavem a Katedrou environmentální ekologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě byla doplňkově u části látek hodnocena herbicidní aktivita a to stanovením inhibice elektronového transportu a redukce chlorofylu *a* a aromatických aminokyselin v chloroplastech špenátu^{235; 236}. Blíže jsou jednotlivé metodiky popsány v příloze **P1**.

5 KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE

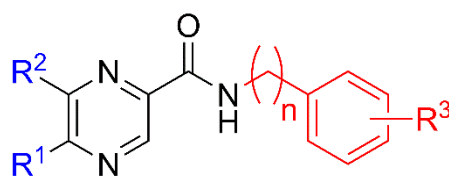
Většina dosažených výsledků uvedených v této disertační práci byla publikována v recenzovaných zahraničních časopisech a prezentována na odborných konferencích formou plakátových sdělení i přednášek. Seznam publikovaných prací a dalších výstupů je uveden v kapitole 7.

V rámci této kapitoly budou připravené deriváty rozděleny dle struktury do dvou hlavních skupin. Komentář bude primárně zaměřen na hledání vztahů mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou. Detailní popis syntéz a použitých metodik, stejně jako analytická data jednotlivých sloučenin jsou uvedeny v odpovídajících článcích uvedených v přílohách **P1 – P6**. Příloha **P7** obsahuje výsledky, které nebyly v době odevzdání disertační práce publikovány.

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

Tato kapitola je zaměřena na komentář publikovaných článků tvořících přílohy **P1 – P3**. Modifikace amidové skupiny byla cíleně navržena za účelem zvýšení lipofility připravených derivátů ve srovnání s PZA, což může pozitivním způsobem ovlivnit biodostupnost (PZA rychle metabolizován jaterními amidasami na POA²³⁷) a také usnadnit průnik molekuly přes lipofilní mykobakteriální buněčnou stěnou. Mnohé *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidy publikované kolektivem prof. Doležala vykazaly slibnou antimykobakteriální aktivitu²³⁸ a staly se tak předlohou pro další modifikaci. Konkrétně byly připraveny tři série sloučenin odvozené od *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu substituované jak na pyrazinovém tak i fenylovém jádře. Celkově je v této kapitole zahrnuto 53 látek, přičemž autorka disertační práce se podílela na syntéze 47 látek. U těchto látek byla mimo *in vitro* antimykobakteriální aktivity dále hodnocena aktivita antifungální, antibakteriální a u části látek též aktivita herbicidní.

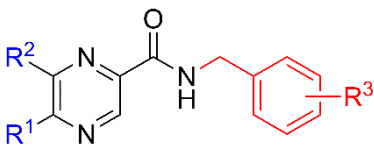
5.1.1 Přehled připravených látek



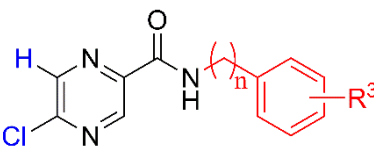
obecná struktura série 1 - 3

$n = 0, 1$

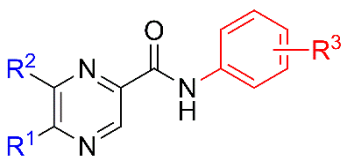
- Série 1 (P1) – *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy

Série 1 (P1)	Pyrazinová část		Fenylová část
	R ¹	R ²	R ³
 <p>Celkem 12 sloučenin</p>	1. H 2. Cl 3. C(CH ₃)	Cl H Cl	1. H 2. 3-CF ₃ 3. 4-Cl 4. 4-OCH ₃

- Série 2 (P2) – *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidy a *N*-fenylnpyrazin-2-karboxamidy

Série 2 (P2)	Pyrazinová část		Fenylová část	
	R ¹	R ²	R ³	
			n = 0	n = 1
 <p>Celkem 16 sloučenin</p>	Cl	H	1. 2-Cl 2. 3-Cl 3. 2,4-OCH ₃ 4. 2-F 5. 3-NO ₂ 6. 4-Br	1. 2-Cl 2. 3-Cl 3. 2,4-OCH ₃ 4. 2-F 5. 3-NO ₂ 6. 4-Br 7. 2-CH ₃ 8. 4-CH ₃ 9. 2,4-Cl 10. 2-CF ₃

- Série 3 (P3) – *N*-fenylnpyrazin-2-karboxamidy

Série 3 (P3)	Pyrazinová část		Fenylová část
	R ¹	R ²	R ³
 <p>Celkem 25 sloučenin</p>	1. H 2. CH ₃ 3. H 4. C(CH ₃) 5. C(CH ₃)	H H Cl H Cl	1. 2-Cl 2. 2-CH ₃ -5-F 3. 3-Cl-4-CH ₃ 4. 2-CH ₃ -5-I 5. 2-I-4-Cl

5.1.2 Syntéza

Výchozí látky, tj. kyselina 6-chlorpyrazin-2-karboxylová, 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylová a 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylová, byly připraveny podle známých v literatuře popsaných syntetických postupů uvedených v kapitole 4.2. POA, 5-hydroxypyrazin-2-karboxylová kyselina a 5-methylpyrazin-2-karboxylová kyselina byly zakoupeny od společnosti Sigma Aldrich (Schnelldorf, Německo).

Cílové sloučeniny byly připraveny dvoustupňovou syntézou přes chlorid substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Potřebné množství výchozí kyseliny bylo rozpuštěno nebo suspendováno v bezvodém toluenu a po přidavku 1,5 ekvivalentu SOCl_2 následně zahříváno k varu po dobu 1 – 1,5 hod. V případě kyseliny 5-hydroxypyrazin-2-karboxylové docházelo současně se vznikem chloridu kyseliny také k substituci hydroxylové skupiny za chlor, reakce byla katalyzována DMF. Přebytek SOCl_2 byl následně odstraněn opakovanou azeotropní destilací s bezvodým toluenem. Chlorid kyseliny byl ihned rozpuštěn v bezvodém acetonu a po kapkách přidán k roztoku příslušného benzylaminu či anilinu s TEA v bezvodém acetonu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty (až 6 hod) a průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Po ukončení reakce byl surový produkt adsorbován na silikagel a přečištěn pomocí flash chromatografie (gradientová eluce, mobilní fáze hexan – ethyl-acetát). Celkové výtěžky chromatograficky přečištěného produktu se pohybovaly v rozmezí 18 – 98 % (průměrně 65 %).

5.1.3 Biologická aktivita

Antimykobakteriální aktivita

U všech připravených látek byla testována antimykobakteriální aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a atypickým mykobakteriím (*M. kansasii* a dvěma kmenům *M. avium*) dle metodik popsaných v kapitole 4.4.1.

• Série 1

Většina látek z této série vykazala mírnou antimykobakteriální aktivitu srovnatelnou s PZA, tj. hodnoty MIC v rozmezí od 6,25 – 25 $\mu\text{g/ml}$ vůči *M. tuberculosis* H37Rv. Nicméně při porovnání hodnot MIC vztažených na molekulovou hmotnost sloučenin, tj. vyjádřenou v $\mu\text{mol/l}$, vykazala část látek aktivitu převyšující PZA. Nejméně aktivní látky z této série jsou uvedeny v **Tabulka 6**. S výjimkou 5-*terc*-butyl-6-chlor-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazin-2-karboxamidu nevykazala žádná z testovaných látek aktivitu vůči atypickým mykobakteriím.

Při porovnání aktivit vzhledem k substituci pyrazinového jádra (**R¹** a **R²**), vykazaly nejvyšší aktivitu deriváty substituované v poloze 5 *terc*-butylem a současně chlorem v poloze 6. Při srovnání

5-chlor derivátů (MIC = 12,5 – 25 µg/ml) a 6-chlor derivátů (MIC = 6,25 – 12,5 µg/ml) byla dvojnásobně vyšší aktivita pozorována u 6-chlor derivátů. Při porovnání aktivit z hlediska substituce fenylového jádra (R^3) se jako nejvhodnější jevila substituce 3-CF₃ a 4-OCH₃. Nejnižší aktivitu vykázaly deriváty substituované pouze v pyrazinové části (R^3 = -H).

Ve srovnání s obdobně substituovanými *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy²³⁸⁻²⁴¹ nebyl po zavedení methylenového můstku mezi fenylové jádro a amidový dusík pozorován nárůst antimykobakteriální aktivity.

Tabulka 6: Přehled nejaktivnějších sloučenin série 1.

R^1	R^2	R^3	MIC (µg/ml)			
			<i>M. tuberculosis</i> ^a	<i>M. kansasii</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c	<i>M. avium</i> ^d
H	Cl	4-OCH ₃	6,25 (22)	100	100	50
C(CH ₃) ₃	Cl	3-CF ₃	6,25 (16)	25	25	25
C(CH ₃) ₃	Cl	4-OCH ₃	6,25 (19)	3,13 (9,4)	12,5	6,25
PZA			6,25 – 12,5 (51-102)	>100	>100	>100
INH			1,56 (11)	12,5 (91)	12,5 – 25	12,5

Údaje uvedené v závorkách vyjadřují hodnoty MIC vztažené na molekulovou hmotnost sloučenin (µmol/l). ^a H37Rv CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 235/80; ^c CNCTC My 80/72; ^d CNCTC My 152/73.

• Série 2

V rámci této série byla antimykobakteriální aktivita připravených *N*-benzyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidů porovnávána s analogicky substituovanými 5-chlor-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy. Hodnoty MIC byly vyjádřeny v µg/ml, respektive vezmeme-li v úvahu molekulovou hmotnost finálních derivátů, v µmol/l. V případě *N*-benzyl derivátů byla ve srovnání s *N*-fenyl deriváty (MIC = 0,78 – 6,25 µg/ml) pozorována výrazně nižší *in vitro* antimykobakteriální aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Nicméně i přesto byla tato aktivita u části *N*-benzyl derivátů srovnatelná s PZA, tj. hodnotami MIC = 12,5 – 25 µg/ml a při přepočtu na molární koncentraci převyšovala aktivitu PZA. Například aktivita *N*-(4-brombenzyl)-5-chlorpyrazin-2-karboxamidu (MIC = 38 µmol/l) a 5-chlor-*N*-(2,4-dichlorbenzyl)pyrazin-2-karboxamidu (MIC = 39 µmol/l) trojnásobně převyšovala aktivitu PZA (MIC = 102 – 203 µmol/l), viz **Tabulka 7**.

V případě *N*-benzyl i *N*-fenyl derivátů se jako nejméně vhodná jevila substituce elektron-donorovými skupinami v poloze *ortho* a *para*, přičemž 2,4-OCH₃ substituce vedla k neúčinným derivátům (MIC >100 µg/ml), pravděpodobně v důsledku snížení penetrace přes mykobakteriální buněčnou stěnu. V rámci této menší série se jako výhodná ukázala substituce elektron-akceptorovými skupinami v poloze *ortho* a *para*, konkrétně substituce 4-Br a 2,4-Cl v případě *N*-benzyl (MIC = 12,5 µg/ml) derivátů, respektive v poloze *ortho* a *meta* u *N*-fenyl derivátů

přičemž 2-Cl derivát vykázal nejvyšší aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC = 0,78 µg/ml).

Aktivita vůči *Mycobacterium kansasii* srovnatelná s INH (MIC = 12,5 µg/ml, respektive 91 µmol/l) nebo převyšující INH byla pozorována u tří *N*-benzyl a dvou *N*-fenyl derivátů, přičemž nejvyšší aktivita byla pozorována u 5-chlor-*N*-(4-methylbenzyl)pyrazin-2-karboxamidu (MIC = 3,13 µg/ml, respektive 12 µmol/l). Žádný z připravených derivátů nevykázal významnou aktivitu vůči testovaným kmenům *Mycobacterium avium*.

Tabulka 7: Přehled neaktivnějších sloučenin série 2.

R ¹	R ²	R ³	n	MIC (µg/ml)			
				<i>M. tuberculosis</i> ^a	<i>M. kansasii</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c	<i>M. avium</i> ^d
Cl	H	4-Br	1	12,5 (38)	50 (153)	>100	>100
Cl	H	4-Br	0	3,13 (10)	6,25 (20)	>100	>100
Cl	H	2-Cl	1	25 (89)	6,25 (22)	>100	>100
Cl	H	2-Cl	0	0,78 (2,9)	n.d.	>100	>100
Cl	H	2,4-Cl	1	12,5 (39)	>100	>100	>100
Cl	H	4-CH ₃	1	25 (96)	3,13 (12)	>100	>100
PZA				12,5 – 25 (102 – 203)	>100	>100	>100
INH				1,56 (11)	12,5 (91)	25	6,25

Údaje uvedené v závorkách vyjadřují hodnoty MIC vztažené na molekulovou hmotnost sloučenin (µmol/l). n.d. = hodnota není k dispozici. ^a H37Rv CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 235/80; ^c CNCTC My 80/72; ^d CNCTC My 152/73.

• Série 3

V rámci této série byla hodnocena aktivita *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů substituovaných lipofilními substituenty jako jsou methylová skupina, halogeny či kombinace halogenů, jak na fenylovém jádře tak i pyrazinovém jádře.

Aktivita nejučinnějších derivátů vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv se v rámci této série pohybovala v rozmezí od 3,13 do 12,5 µg/ml. Porovnáme-li hodnoty MIC v µmol/l, pak aktivita některých derivátů převyšovala aktivitu PZA a to i desetinásobně. Přehled sloučenin je uveden v **Tabulka 8**.

Z hlediska substituce pyrazinového jádra nejvyšší aktivitu vykázaly anilidy odvozené od nesubstituované POA a 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny. Na druhou stranu deriváty odvozené od 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny nevykázaly žádnou aktivitu vůči testovaným kmenům (MIC >100 respektive >50 µg/ml), což je v rozporu s dříve popsány SAR v sérii anilidů publikovaných prof. Doležalem^{238; 241}.

Při posouzení substituce na fenylovém jádře se jako nejvýhodnější ukázala být substituce 3-Cl-4-CH₃, což odpovídá i dříve popsáným SAR^{238; 241}, u kterých substituce elektron-

akceptorovou skupinou v poloze *meta* (-F, -I, -CF₃, 3,5-CF₃) a elektron-donorovou skupinou v poloze *para* například -CH₃ a -CH(CH₃)₂ vedla k nárůstu antimykobakteriální aktivity. Jako nevýhodné se ukázaly substituce halogenem v *ortho* poloze (2-Cl, 2-I), jejichž aktivita byla většinou zanedbatelná ve srovnání s ostatními deriváty z této série, což je pravděpodobně dáno sterickými efekty 2-halogenů.

Je zajímavé, že deriváty substituované na fenylovém jádře skupinou 3-Cl-4-CH₃ vykázaly též aktivitu i vůči *Mycobacterium kansasii* srovnatelnou s INH. Podobně tomu bylo i v případě *N*-(4-chlor-2-jodfenyl)pyrazin-2-karboxamidu. Žádný z připravených derivátů nevykázal aktivitu vůči testovaným kmenům *Mycobacterium avium*.

Tabulka 8: Přehled neaktivnějších sloučenin série 3.

R ¹	R ²	R ³	MIC (µg/ml)		Cytotoxicita HepG2	
			<i>M. tuberculosis</i> ^a	<i>M. kansasii</i> ^b	IC ₅₀ (µmol/l)	SI
H	H	3-Cl-4-CH ₃	12,5 (50)	3,13 (13)	>250 ^c	>4,95
CH ₃	H	3-Cl-4-CH ₃	3,13 (12)	12,5 (48)	>100 ^c (343,5) ^d	>8,36 (28,7) ^e
H	Cl	3-Cl-4-CH ₃	3,13 (11)	100	>250 ^c (820,7) ^d	>22,54 (74,0) ^e
C(CH ₃) ₃	H	2-CH ₃ -5-F	3,13 (11)	>100	>50 ^c (573,3) ^d	>4,59 (52,6) ^e
H	Cl	2-CH ₃ -5-I	3,13 (8,4)	>100	>50 ^c (653,8) ^d	>5,97 (78,0) ^e
H	H	2-I-4-Cl	6,25 (17)	3,13 (8,7)	>100 ^c	>5,75
PZA			12,5 (102)	>100	n. d.	n. d.
INH			0,2 – 0,78 (1,5 – 5,7)	1,56 – 6,25 (11 – 46)	n. d.	n. d.

Údaje uvedené v závorkách vyjadřují hodnoty MIC vztažené na molekulovou hmotnost sloučenin (µmol/l). n. d. = hodnota není k dispozici. ^a H37Rv CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 235/80. ^c Při vyšších koncentracích docházelo k precipitaci sloučenin v médiu. ^d Hodnoty IC₅₀ vypočítané dle inhibiční křivky. ^e Hodnoty SI vypočítané z hypotetických IC₅₀.

Tabulka 9: Antifungální aktivita vybraných látek ze série 1 – 3.

R ¹	R ²	R ³	n	TM MIC (µmol/l)	
				72 hod	120 hod
Cl	H	3-CF ₃	1	15,62	15,62
H	Cl	3-CF ₃	1	62,5	125
H	Cl	5-F-2-CH ₃	0	31,25	62,5
FLU				1,95 – 7,81	3,9 – 62,5
AMB				1,95	1,95

Antifungální a antibakteriální aktivita

Naprostá většina připravených sloučenin vykázala zanedbatelnou antibakteriální a antifungální aktivitu (MIC >250 µmol/l) ve srovnání s použitými standardy s výjimkou dvou

látek ze série 1 a jedné látky ze série 3. U těchto látek byla pozorována selektivní antifungální aktivita vůči *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM) blízká aktivitě flukonazolu, viz **Tabulka 9**. V případě ostatních testovaných kmenů byly hodnoty MIC těchto tří látek >250 $\mu\text{mol/l}$ respektive >500 $\mu\text{mol/l}$.

Cytotoxicita

V rámci série 3 byla u neaktivnějších derivátů hodnocena cytotoxicita na HepG2, tj. buněčné linii připravené z lidského hepatoblastomu, a to s použitím standardního protokolu^{233; 234}. Výsledky byly vyjádřeny pomocí IC_{50} , tj. koncentrace potřebné k inhibici růstu u 50 % buněk ve srovnání s kontrolou. Díky omezené rozpustnosti látek v testovacím mediu byly hodnoty IC_{50} většiny látek odvozeny z průběhu inhibiční křivky. Nicméně ani při nejvyšších koncentracích dosažených při ředění látek nebyl pozorován cytotoxický efekt na HepG2 buňky.

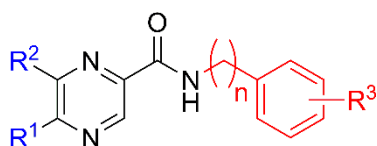
Hodnoty IC_{50} odvozené z průběhu inhibiční křivky se pohybovaly ve stovkách $\mu\text{mol/l}$ (viz **Tabulka 8**), což při srovnání s dříve publikovanými anilidy 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (IC_{50} v řádu jednotek až desítek $\mu\text{mol/l}$ ²⁴²) svědčí o nízké toxicitě těchto látek. Index selektivity (SI) byl vypočítán jako podíl IC_{50} a MIC pro *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (v $\mu\text{mol/l}$). Pokud při výpočtu SI vycházíme z odhadnutých hodnot IC_{50} , SI většiny látek byl vyšší než 10, což svědčí o jejich dostatečné bezpečnosti.

Herbicidní aktivita

V případě série 1 byly látky studovány i z hlediska herbicidní aktivity a to stanovením inhibice elektronového transportu (inhibice fotosyntetické aktivity chloroplastů) a redukce fluorescence chlorofylu *a* a aromatických aminokyselin v chloroplastech špenátu. Jednotlivé metody jsou blíže popsány v příloze **P1**. V případě inhibice fotosyntetické aktivity byla studována rychlost vývoje kyslíku v chloroplastech a výsledky byly vyjádřeny pomocí IC_{50} , tj. koncentrace látky vedoucí k 50% poklesu rychlosti vývoje kyslíku v chloroplastech. Z důvodu nízké rozpustnosti v testovacím mediu byla hodnocena pouze část látek, jejichž hodnoty IC_{50} byly v rozmezí od 7,4 do 1623,0 $\mu\text{mol/l}$. Inhibice fotosyntetické aktivity obecně závisí na lipofilitě testovaných látek, není proto překvapením, že nejvyšší inhibice fotosyntetické aktivity chloroplastů a tedy nejnižší hodnoty IC_{50} byly pozorovány u derivátů odvozených od 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny. Konkrétně se jednalo o 5-*terc*-butyl-6-chlor-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamid ($\text{IC}_{50} = 7,4 \mu\text{mol/l}$) a 5-*terc*-butyl-6-chlor-*N*-(4-chlorbenzyl)-pyrazin-2-karboxamid ($\text{IC}_{50} = 13,4 \mu\text{mol/l}$). Aktivita ostatních látek ve srovnání se standardem tj. *N'*-(3,4-dichlorfenyl)-*N,N*-dimethylmočovinou (Diuron[®], $\text{IC}_{50} = 1,9 \mu\text{mol/l}$) byla zanedbatelná. V případě dvou výše uvedených aktivních látek byla potvrzena schopnost redukovat fluorescenci chlorofylu *a* a aromatických aminokyselin, a inhibovat elektronový transport v chloroplastech špenátu vazbou na fotosystém II, tj. první proteinový komplex ve světelné fázi fotosyntézy.

Obdobný mechanismus herbicidního účinku byl popsán i u anilidů odvozených od 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny a 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny²⁴³.

5.1.4 SAR



R¹: -H, -Cl, -CH₃, -C(CH₃)₃

R²: -H, -Cl

n = 0 - 1

R³: -H, 2-Cl, 2-F, 2-CH₃, 2-CF₃, 3-Cl, 3-CF₃, 3-NO₂,
4-Cl, 4-Br, 4-CH₃, 4-OCH₃, 2,4-OCH₃, 2,4-Cl,
2-CH₃-5-F, 3-Cl-4-CH₃, 2-CH₃-5-I, 2-I-4-Cl

Při srovnání antimykobakteriální aktivity jednotlivých sérií odvozených od *N*-benzyl a *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidu byly identifikovány (s jistými odchylkami) následující SAR, které jsou ve shodě s dříve popsanými SAR u anilidů POA²³⁸⁻²⁴¹:

- Substituce fenylového jádra vedoucí k zvýšení/zachování antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv:
 - elektron-akceptorová skupina v poloze *meta* (3-Cl, 3-CF₃, 3-NO₂, 5-F, 5-I),
 - elektron-donorová skupina v poloze *para* (4-OCH₃, 4-CH₃).
- Substituce fenylového jádra vedoucí ke snížení/ztrátě antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv:
 - elektron-donorová skupina v poloze *ortho* i *para* (2,4-OCH₃)
 - elektron-akceptorová skupina v poloze *ortho* (2-Cl, 2-I) s výjimkou série 2 (viz dále).
- Zavedení methylenového můstku mezi fenylové jádro a dusík amidové skupiny nevedlo k dalšímu zvýšení aktivity ve srovnání s analogicky substituovanými anilidy, respektive bylo pozorováno i snížení aktivity (ne ztráta aktivity) v případě derivátů odvozených od 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.
- *Mycobacterium kansasii* – v případě substituce elektron-donorovými skupinami byly vyvozeny obdobné závěry jako v případě *M. tuberculosis*, tj. substituce v poloze *para* (4-OCH₃, 4-CH₃) vede k nárůstu aktivity. Pozitivní vliv měla i substituce elektron-akceptorovou skupinou – halogenem (2-Cl, 2-F, 3-Cl, 2-I-4-Cl, 3-CF₃, 4-Br) či 3-NO₂.
- Obecné závěry v případě substituce pyrazinového jádra nebylo možné v rámci prezentovaných sérií odvodit. Na výslednou aktivitu měla vliv jak substituce pyrazinového, tak fenylového jádra.
- Ačkoliv byl u dříve publikovaných derivátů pozorován nárůst antimykobakteriální aktivity se zvyšující se lipofilitou látek, v sériích 1 – 3 nebyla pozorována přímá souvislost mezi nárůstem lipofility a zvýšením antimykobakteriální aktivity.

Jisté odchylky od těchto obecných SAR byly pozorovány u derivátů série 2 odvozených od 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny. V případě *N*-benzyl derivátů měla pozitivní vliv substituce elektron-akceptorovými skupinami v poloze *ortho* a *para*, kdežto v případě *N*-fenylových derivátů v poloze *ortho* a *meta*. Mimo 5-chlor-*N*-fenylnpyrazin-2-karboxamidy uvedené v příloze **P2** bylo připraveno a publikováno dalších 24 anilidů²⁴². Na rozdíl od *N*-benzyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidů většina anilidů vykazala velmi slibnou *in vitro* aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv s hodnotami MIC převážně v rozmezí 0,39 – 3,13 µg/ml bez výrazného vlivu substituentu na výslednou antimykobakteriální aktivitu. Nicméně tyto anilidy byly poměrně cytotoxické na HepG2 s hodnotami IC₅₀ v řádu jednotek a desítek µmol/l²⁴².

Na rozdíl od anilidů 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny²⁴² vykazala většina testovaných derivátů ze série 3 (**P3**) hodnoty IC₅₀ odvozené z průběhu inhibiční křivky ve stovkách µmol/l, což svědčí i o nízké toxicitě těchto derivátů.

5.1.5 Závěr

Na základě výsledků antimykobakteriální aktivity s sériích *N*-benzyl a *N*-fenylnpyrazin-2-karboxamidů byly identifikovány substituenty, které zavedením na fenylové jádro pozitivně ovlivňují tuto aktivitu, tak i modifikace, které vedly ke snížení aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (prodloužení spojovacího řetězce zavedením methylenové skupiny mezi fenylové jádro a karboxamid). Dosažené závěry jsou ve shodě s dříve popsány SAR u anilidů POA připravených pracovní skupinou prof. Doležala²³⁸⁻²⁴¹. Jelikož bylo publikováno značné množství anilidů a *N*-benzyl derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny, další možnosti substituce fenylového jádra tak byly poměrně vyčerpány. Následující práce směřovala k modifikaci pyrazinového jádra.

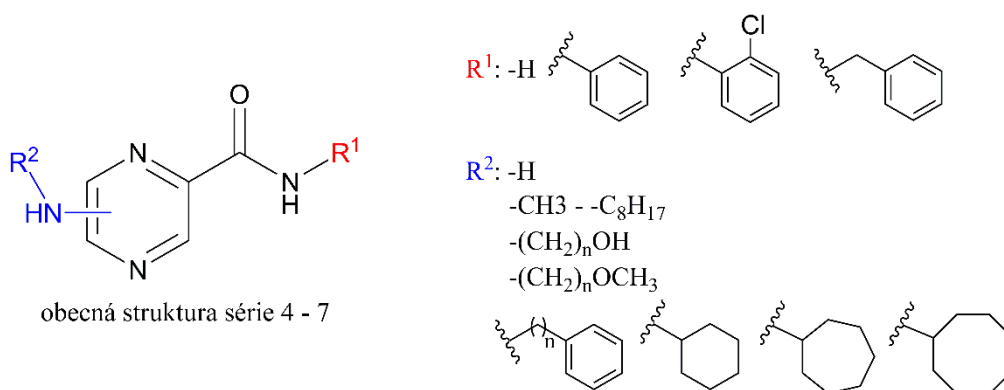
5.2 Příprava a biologická aktivita alkylaminoderivátů pyrazinamidu, *N*-fenyl a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu

Tato kapitola je zaměřena na komentář publikovaných článků tvořících přílohy **P4 – P6** a v době odevzdání práce nepublikovaných výsledků tvořících přílohu **P7**.

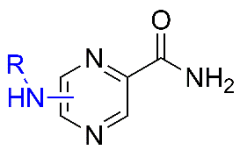
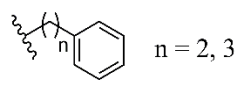
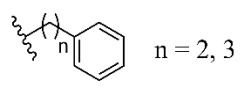
Prvotní myšlenkou byla příprava derivátů vycházejících z 5-Cl-PZA, který byl vybrán z následujících důvodů: 5-Cl-PZA má známý mechanismus účinku (inhibice FAS I)¹⁵² a vykázal slibnou aktivitu *in vitro* vůči *Mycobacterium tuberculosis* i atypickým mykobakteriím rezistentním vůči PZA²⁴⁴. Nicméně *in vivo* na myším modelu nevykázal žádnou aktivitu pravděpodobně z důvodu rychlé metabolizace či nedostatečné farmakokinetiky²⁴⁵. V první fázi byly připraveny deriváty vzniklé substitucí chloru za aminoskupinu, alkylamino- a fenyalkylamino skupinu. Následně byly připraveny odpovídající polohové isomery odvozené od 6-chlorpyrazin-2-karboxamidu. V další fázi byla zachována alkylamino substituce na pyrazinovém jádře a pozměněna amidová část molekuly (*N*-fenyl a *N*-benzyl deriváty). Mimo alifatické alkylamino deriváty byly připraveny i cykloalkylamino deriváty či deriváty s modifikovaným alkylovým řetězcem (terminální hydroxy či methoxy skupina).

Celkově je v této kapitole zahrnuto 70 látek, přičemž autorka disertační práce se podílela na syntéze 64 látek. Mimo *in vitro* antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a atypickým mykobakteriím byla u části látek hodnocena též aktivita vůči MDR kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Dále byla hodnocena aktivita antifungální, antibakteriální a u části látek též aktivita antivirová. Z jednotlivých sérií byly vybrány látky s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou, které byly následně hodnoceny z hlediska vlivu na syntézu mykolových a mastných kyselin a dalších složek mykobakteriální buněčné stěny – viz kapitola 4.4.4.

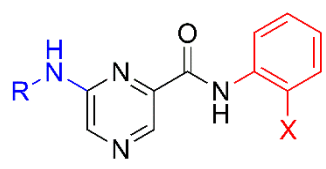
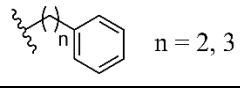
5.2.1 Přehled připravených látek



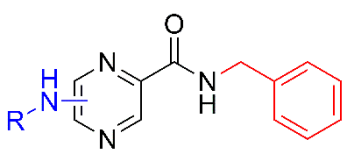
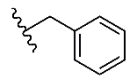
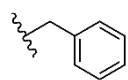
- Série 4 (P4) – alkylamino a fenylalkylamino deriváty PZA

Série 4 (P4)	Poloha	R
 <p>Celkem 22 sloučenin</p>	5	-H -CH ₃ – -C ₈ H ₁₇  n = 2, 3
	6	-H -CH ₃ – -C ₈ H ₁₇  n = 2, 3

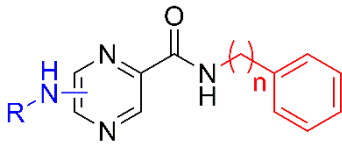
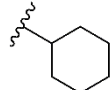
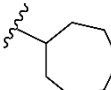
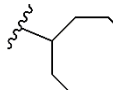
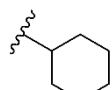
- Série 5 (P5) – alkylamino a fenylalkylamino deriváty *N*-fenyl a *N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidu

Série 5 (P5)	X	R
 <p>Celkem 19 sloučenin</p>	-H	-C ₃ H ₇ – -C ₈ H ₁₇ -(CH ₂) ₃ OH -(CH ₂) ₄ OH -(CH ₂) ₅ OH -(CH ₂) ₂ OCH ₃ -(CH ₂) ₃ OCH ₃  n = 2, 3
	-Cl	-C ₃ H ₇ – -C ₈ H ₁₇

- Série 6 (P6) – alkylamino a fenylalkylamino deriváty *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu

Série 6 (P6)	Poloha	R
 <p>Celkem 17 sloučenin</p>	6	-C ₄ H ₉ – -C ₈ H ₁₇ 
	5	-C ₄ H ₉ – -C ₈ H ₁₇
	3	-C ₄ H ₉ – -C ₈ H ₁₇ 

- Série 7 (P7) – cykloalkylamino deriváty *N*-fenyl a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu

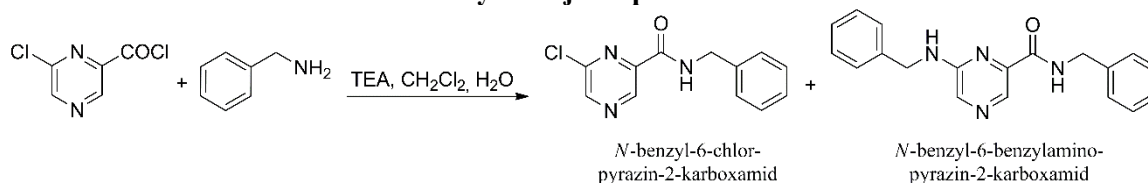
Série 7 (P7)	Poloha	N	R
 <p>Celkem 12 sloučenin</p>	5	0	
		1	
	6	0	
		1	

5.2.2 Syntéza

Syntéza výchozích látek

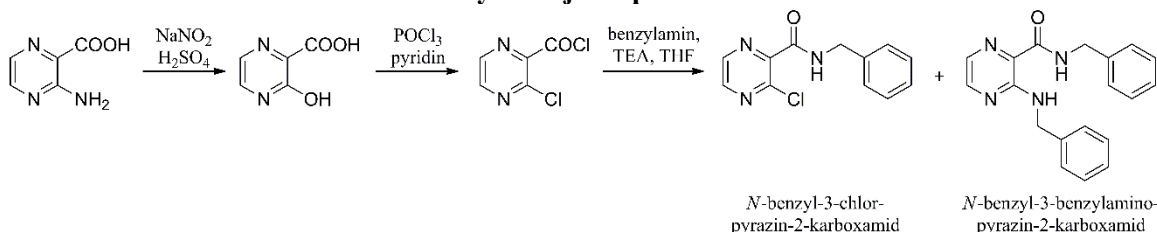
Výchozí látky byly připraveny pomocí dvoustupňové syntézy vycházející z odpovídající pyrazin-2-karboxylové kyseliny²⁰⁴⁻²⁰⁶, kdy reakcí s SOCl_2 vznikal chlorid příslušné kyseliny a následnou amonolýzou/aminolýzou příslušný amid POA. 6-Chlorpyrazin-2-karboxamid (6-Cl-PZA) a 5-Cl-PZA byly připraveny amonolýzou příslušného chloridu kyseliny vodným roztokem amoniaku (25%). 6-Chlor-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamid, *N*-benzyl-6-chlorpyrazin-2-karboxamid a odpovídající 5-chlor isomery byly připraveny aminolýzou chloridu příslušné kyseliny reakcí s anilinem či benzylaminem. Z důvodu nízkých reakčních výtěžků byl v případě syntézy *N*-benzyl-6-chlorpyrazin-2-karboxamidu obecný postup nahrazen Schottenovou-Baumannovou acylací (popsáno v příloze **P6**). Ačkoliv došlo ke zvýšení výtěžnosti reakce (výtěžek chromatograficky čistého produktu 63 %), celkový výtěžek reakce byl snížen z důvodu tvorby vedlejšího produktu – *N*-benzyl-6-benzylaminopyrazin-2-karboxamidu (viz **Schéma 7**), který vznikal v poměru 1:5.

Schéma 7: Příprava výchozí látky tj. *N*-benzyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamidu za současné tvorby vedlejšího produktu.



Obdobný vedlejší produkt vznikal též při syntéze *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu vycházející z 3-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny^{246; 247}, viz **Schéma 8** (detailní popis syntézy uveden v příloze **P6**).

Schéma 8: Příprava výchozí látky tj. *N*-benzyl-3-chlorpyrazin-2-karboxamidu za současné tvorby vedlejšího produktu.

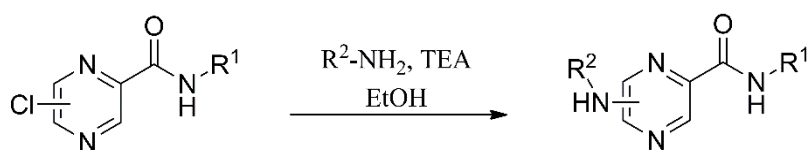


Aminodehalogenační reakce

Na rozdíl od dříve publikované syntézy alkylamino derivátů pyrazin-2,5-dikarbonitrilu²¹⁴ a 5-kyanpyrazin-2-karboxamidu²¹³ pobíhala aminodehalogenační reakce za laboratorní teploty velmi

pomalou. Pro urychlení reakce byl použit nadbytek alkylaminu (3 – 5 molárních ekvivalentů) a báze (TEA), reakční směs byla následně zahřívána k varu (ethanol) po dobu až 8 hod, viz **Schéma 9**. Substituce probíhala rychleji do polohy 5 (reakční doba 2 hod). Po evaporaci rozpouštědla byl přebytek alkylaminu odstraněn vytřepáním do vody okyselené 35% HCl (finální koncentrace – maximálně 5% HCl). Organická fáze (CH₂Cl₂) byla následně vysušena bezvodým síranem sodným, adsorbována na silikagel a přečištěna pomocí flash chromatografie. Finální produkty byly v případě potřeby rekrystalizovány z ethanolu s přidavkem aktivního uhlí.

Schéma 9: Obecné schéma aminodehalogenační reakce.



R¹ = H, fenyl, 2-chlorofenyl, benzyl

R² = alkyl, fenylalkyl, cykloalkyl

Díky nižší reaktivitě a těkavosti amoniaku byl 5- respektive 6-aminopyrazin-2-karboxamid připraven s využitím mikrovlnného reaktoru v uzavřených silnostěnných zkumavkách, reakční podmínky: 200 W, 95 °C, 30 min. V případě syntézy methylamino a ethylamino derivátů byla reakční směs probublávána plynným methylaminem (generovaným z vodného roztoku jeho hydrochloridu) respektive ethylaminem, detailní popis syntézy uveden v příloze **P4**. Syntéza 3-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů byla urychlena použitím mikrovlnného reaktoru dle následujících reakčních podmínek²⁴⁸: 120 W, 140 °C, 30 min, methanol, pyridin.

Celkové výtěžky chromatograficky přečištěných produktů se pohybovaly v rozmezí 28 – 91 % (průměrně 56 %).

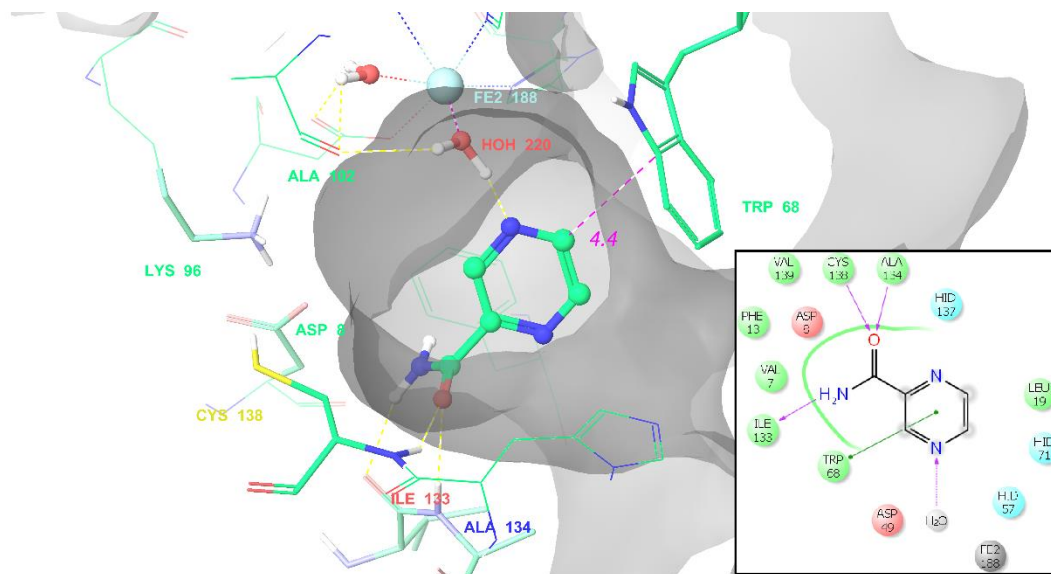
5.2.3 Docking

Nikotinamidas/pyrazinamidas

Při studiu možného mechanismu účinku byla uvažována možnost, že připravené alkylamino deriváty účinkují jako proléčiva, která jsou prostřednictvím nikotinamidas/pyrazinamidas (PncA) enzymaticky hydrolyzována na příslušnou pyrazin-2-karboxylovou kyselinu. Nicméně u některých derivátů jako je například 5-Cl-PZA bylo prokázáno, že účinkuje v nehydrolyzované formě^{149; 152}. Kavita, do které se váže PZA (viz **Obrázek 8**) či substrát, je poměrně malá (na průřezu přibližně 10 Å × 7 Å). Vlastní katalytické místo se nachází na dně této kavity a je tvořeno zbytky třech aminokyselin – Lys96, Asp8 a Cys138¹⁸⁸. Karboxamidová skupina štěpeného substrátu tedy

musí být správně orientována do katalytického místa tak, aby Cys138 mohl vytvořit kovalentní vazbu s karbonylovým uhlíkem karboxamidové skupiny.

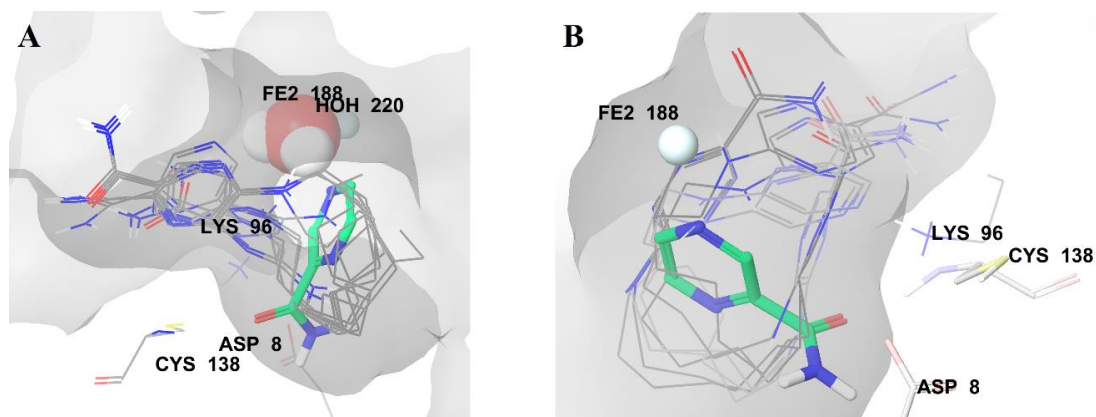
Obrázek 8: Orientace PZA do katalytického místa PncA.*



* PncA (PDB: 3PL1). Převzato a upraveno viz příloha P4.

Možnost hydrolyzy amidové skupiny prostřednictvím PncA byla studována u alkyamino derivátů odvozených od PZA (série 4) a *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu (série 5). Detailní popis orientace molekul do katalytického místa PncA je uveden v přílohách P4 a P5. V případě 5- a 6-alkylaminopyrazin-2-karboxamidů byla amidová skupina orientována mimo katalytické místo PncA (viz **Obrázek 9**). Z tohoto důvodu je nepravděpodobné, že by zmiňované látky byly substrátem PncA.

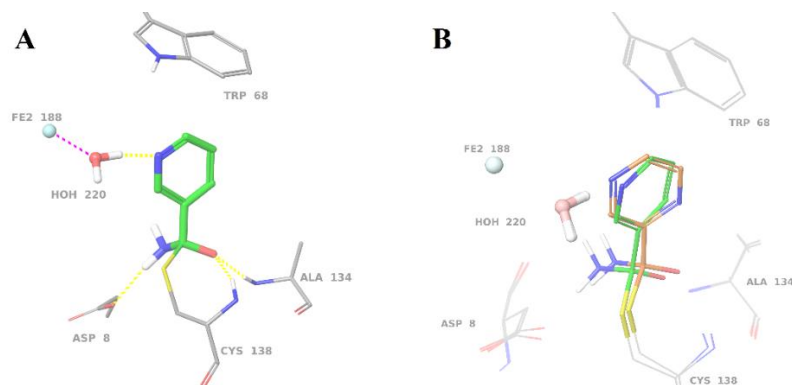
Obrázek 9: Orientace 5- a 6-alkylaminopyrazin-2-karboxamidů do PncA v přítomnosti molekuly vody HOH 220 (A) či bez vody (B).*



* PncA (PDB: 3PL1). V obou případech je zřejmé, že je karboxamidová skupina orientována mimo katalytickou triádu (Lys96, Asp8 a Cys138). * Převzato a upraveno viz příloha P4.

Vlastní hydrolyza karboxamidu prostřednictvím PncA probíhá tvorbou kovalentního komplexu mezi acylem substrátu a enzymem (thiolovou skupinou Cys138)¹⁸⁸. Tento komplex je stabilizovaný interakcemi se zbytky aminokyselin katalytického místa, které jsou klíčové pro hydrolyzu substrátu. V případě známých substrátů PncA PZA a nikotinamidu, byly pozorovány stejné interakce s aminokyselinami v katalytickém místě (viz **Obrázek 10**).

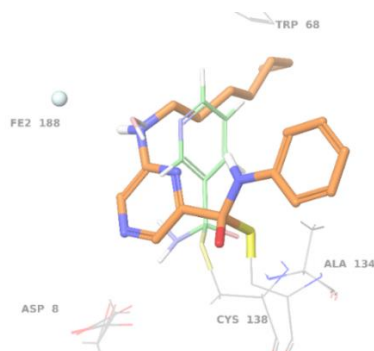
Obrázek 10: Kovalentní komplex nikotinamid-Cys138 stabilizovaný interakcemi se zbytky aminokyselin (A) a překrytí PZA a nikotinamidu v katalytickém místě PncA (B).



* PncA (PDB: 3PL1). Převzato viz příloha P5.

Z důvodu stericky objemné substituce v poloze 6 a fenylového jádra vázaného na karboxamid bylo v případě 6-propylamino a 6-heptylamino derivátů *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu pozorováno více konformací sloučeniny do katalytického místa. Z tohoto důvodu byl při dockování těchto dvou sloučenin do PncA použit protokol předpovídající tvorbu kovalentního komplexu. Ačkoliv docházelo k tvorbě komplexu mezi acylem karboxamidové skupiny a thiolovou skupinou Cys138, tento komplex nebyl dostatečně stabilizován interakcemi popsány pro PZA a nikotinamid, orientace komplexu do katalytického místa viz **Obrázek 11**. Není tedy pravděpodobné, že by 6-alkylamino deriváty *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu byly substrátem PncA.

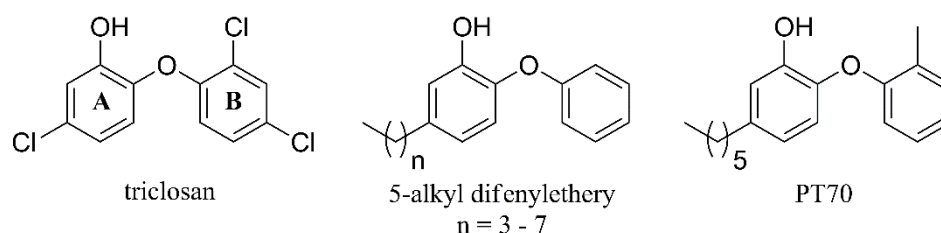
Obrázek 11: Srovnání orientace komplexu *N*-fenyl-6-heptylaminyopyrazin-2-karboxamid-Cys138 (oranžová barva) s komplexem nikotinamid-Cys138 (zelená barva) v katalytickém místě PncA.*



* PncA (PDB: 3PL1). Převzato viz příloha P5.

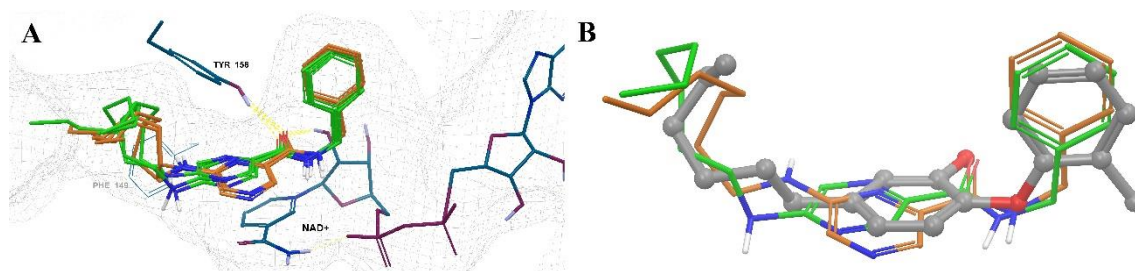
Enoyl-ACP reductasa

Mezi známé inhibitory InhA patří mimo INH i triklosan (TCL). V nedávné době byly připraveny deriváty TCL – difenyletery s alifatickým alkylovým řetězcem vázaným do polohy 5 (A-kruh). Inhibiční aktivita těchto derivátů vůči InhA narůstá s prodlužujícím se alkylovým řetězcem, přičemž 2-fenoxy-5-oktylfenol vykázal *in vitro* inhibici InhA v koncentracích $IC_{50} = 5 \text{ nmol/l}$, čímž výrazně převyšuje aktivitu TCL ($IC_{50} = 1 \text{ } \mu\text{mol/l}$)²⁴⁹. Na základě jisté strukturální podobnosti s 5-alkyl deriváty TCL byla jako cíl 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů navržena inhibice InhA.



Při dokování 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů a odpovídajících 6-isomerů do InhA (PDB: 2X23, metodika uvedena v příloze P6) byly pozorovány interakce s enzymem typické pro deriváty TCL (například PT70), viz **Obrázek 12**.

Obrázek 12: Orientace 6-alkylamino derivátů a odpovídajících 5-isomerů do aktivního místa InhA (A), srovnání orientace alkylamino derivátů *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu s PT70 (B).*



* InhA (PDB: 2X23). Uhlíky 6-alkylamino derivátů znázorněny oranžovou barvou, 5-alkylaminoderivátů zelenou barvou. PT70 znázorněno šedou barvou. Převzato viz příloha P6.

Pyrazinové jádro je orientováno stejně jako fenolové jádro PT70 (A-kruh), vytváří π - π interakce s nikotinamidovým jádrem NAD^+ a π - π interakce s Phe149. Benzylové jádro je orientováno do hydrofobní kavity stejně jako B-kruh TCL derivátů. Karboxamidová skupina vytváří vodíkové můstky s tyrosinem 158 (Tyr158) a 2'-hydroxylem ribózy NAD^+ . Alkylamino skupina je orientována do štěrbině vedoucí k povrchu enzymu (podobně jako alkylový řetězec meziproductů při syntéze mykolových kyselin). Na základě výsledků této dockingové studie byly

vybrány *N*-benzyl-6-heptylamino-pyrazin-2-karboxamid a *N*-benzyl-5-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid jakožto možné inhibitory InhA. Tato hypotéza byla studována *in vitro* stanovením vlivu těchto derivátů na syntézu mastných a mykolových kyselin (viz kapitola 5.2.5). Navržený mechanismus účinku nicméně nebyl potvrzen.

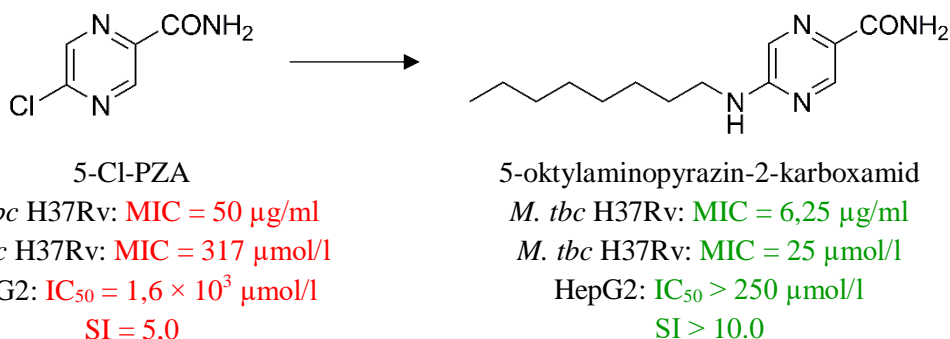
5.2.4 Biologická aktivita

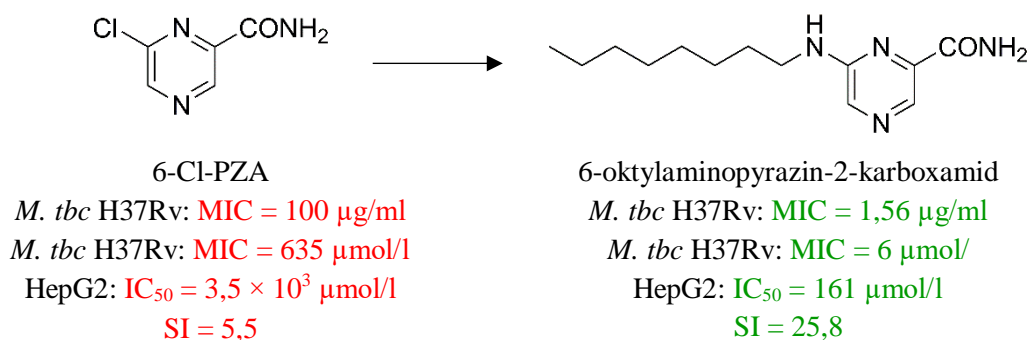
Antimykobakteriální aktivita

U všech připravených látek (včetně výchozích) byla testována antimykobakteriální aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a atypickým mykobakteriím - *M. kansasii* a dvěma kmenům *M. avium* dle metodik popsanych v kapitole 4.4.1. Výsledky byly vyjádřeny pomocí MIC v $\mu\text{g/ml}$, respektive s ohledem na molekulovou hmotnost derivátů v $\mu\text{mol/l}$.

• Série 4

Z výchozích látek vykázal slabou aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pouze 5-Cl-PZA a to MIC = 50 $\mu\text{g/ml}$ (dle literatury MIC = 8-32 $\mu\text{g/ml}$ ²⁴⁴), 6-Cl-PZA byl neaktivní (MIC = 100 $\mu\text{g/ml}$). Substituce chloru za amino či alkylamino skupinu s krátkým řetězcem (C1 – C5) vedla k poklesu či ztrátě antimykobakteriální aktivity (MIC \geq 100 $\mu\text{g/ml}$) v případě 5-isomerů. S rostoucí délkou alkylového řetězce byl pozorován nárůst antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv kulminující v případě obou polohových isomerů u derivátů s oktylamino skupinou (MIC = 1,56 – 6,25 $\mu\text{g/ml}$, tj. 6 – 25 $\mu\text{mol/l}$). Ve srovnání s PZA (MIC = 12,5 – 25 $\mu\text{g/ml}$, tj. 102 – 205 $\mu\text{mol/l}$) tak oba oktylamino deriváty vykázaly výrazně vyšší aktivitu. Rozdíly v aktivitě mezi polohovými isomery byly pozorovány v případě substituce fenyalkylamino skupinou, kdy náhrada části řetězce za fenylové jádro vedla k úplné ztrátě aktivity u 6-isomerů, kdežto u 5-isomerů byla aktivita zachována (MIC = 25 – 50 $\mu\text{g/ml}$).





U heptylamino a oktylamino derivátů (obou polohových isomerů) byla dále pozorována aktivita i vůči atypickým mykobakteriím, které jsou přirozeně rezistentní vůči PZA. Vyšší aktivitu vůči *Mycobacterium kansasii* vykázaly 5-isomery (MIC = 6,25 – 12,5 µg/ml), nicméně 6-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid vykázal aktivitu i vůči oběma testovaným kmenům *Mycobacterium avium* (MIC = 25 µg/ml).

• Série 5

Podobné vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou jako v případě série 4 byly pozorovány i u série 5, tj. 6-alkylamino-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidů a 6-alkylamino-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamidů, respektive odpovídajících 5-isomerů (publikováno Zitko et al.²⁵⁰). Z důvodu nízké antimykobakteriální aktivity publikované v dřívějších pracích^{213; 214} nebyly připraveny deriváty s methylamino a ethylamino substitucí.

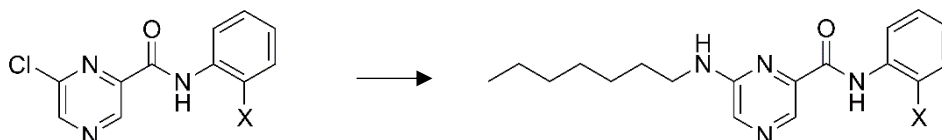
Co se aktivity výchozích látek týká, pouze 6-chlor-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamid vykázal slabou aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC = 25 µg/ml). Substituce chloru za alifatickou alkylamino skupinu vedla k nárůstu aktivity u všech alkylaminoderivátů. Hodnoty MIC u neúčinnějších sloučenin se pohybovaly v rozmezí 1,56 – 3,13 µg/ml tj. 5 – 10 µmol/l, což odpovídá hodnotám MIC INH (2 – 11 µmol/l), respektive výrazně převyšuje aktivitu PZA (MIC = 102 µmol/l). Mírně vyšší aktivita byla pozorována v případě anilidů nesubstituovaných na fenylovém jádře.

Modifikace alkylového řetězce (terminální methoxy či hydroxy skupina) vedla k výraznému snížení či ztrátě aktivity. Obdobně tomu byli v případě náhrady části řetězce za aromatické jádro.

Žádná z látek nevykázala aktivitu vůči testovaným kmenům *Mycobacterium avium* a pouze 2 sloučeniny a to 6-oktylamino-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamid (MIC = 6,25 µg/ml, tj. 19 µmol/l) a 6-hexylamino-*N*-(2-chlorfenyl)-pyrazin-2-karboxamid (MIC = 6,25 µg/ml, tj. 19 µmol/l) vykázaly aktivitu vůči *Mycobacterium kansasii* srovnatelnou s INH (MIC = 1,56 - 6,25 µg/ml, tj. 11 – 46 µmol/l).

Na rozdíl od předchozí série 4 byly pozorovány značné rozdíly v aktivitě 5- a 6-isomerů, a to především vůči atypickým mykobakteriím. 5-Isomery s nesubstituovaným fenylovým jádrem vykázaly mírně vyšší aktivitu (MIC = 0,78 – 3,13 µg/ml, tj. 2,5 – 12 µmol/l)²⁵⁰ vůči

Mycobacterium tuberculosis H37Rv než odpovídající 6-isomery. U těchto derivátů byla navíc pozorována výrazná aktivita vůči *Mycobacterium kansasii* (MIC = 0,78 – 12,5 µg/ml, tj. 2,6 – 49 µmol/l) srovnatelná či převyšující aktivitu INH (MIC = 1,56 – 6,25 µg/ml, tj. 11 - 46 µmol/l). Modifikací alkylového řetězce došlo k poklesu či úplné ztrátě aktivity. Pokles aktivity odpovídal poklesu lipofility. S výjimkou 5-heptylamino derivátu (MIC = 12,5 µg/ml) vedla substituce fenylového jádra 2-Cl ke ztrátě aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv²⁵⁰, což naznačuje možnost interakce se specifickým cílem a rozdílný mechanismus účinku 5- a 6-isomerů.



6-chlor-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid
M. tbc H37Rv: MIC = 25 µg/ml

6-heptylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid
M. tbc H37Rv: MIC = 1,56 µg/ml

6-chlor-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid
M. tbc H37Rv: MIC = 100 µg/ml

6-heptylamino-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid
M. tbc H37Rv: MIC = 3,13 µg/ml

Hexylamino – oktylamino deriváty, tj. látky s nejvyšší aktivitou vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, byly dále testovány z hlediska aktivity vůči rezistentním kmenům (kompletní výsledky viz příloha P5). U všech těchto látek byla pozorována pouze mírná aktivita vůči testovaným kmenům (MIC = 16 – 62,5 µmol/l), která byla srovnatelná či nižší než aktivita INH (MIC = 16 µmol/l).

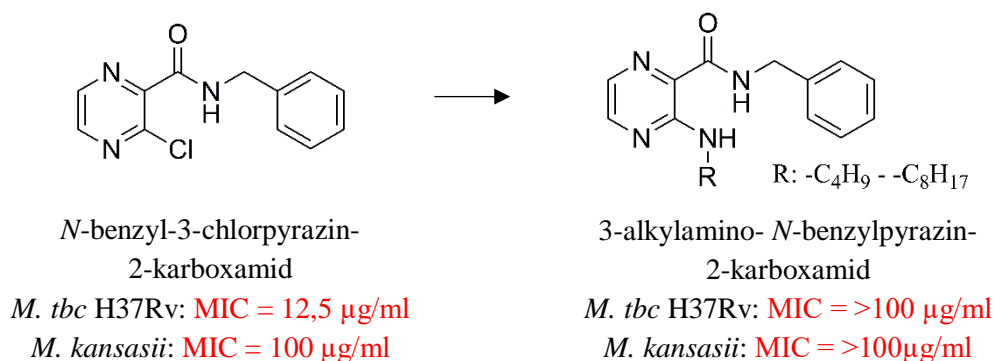
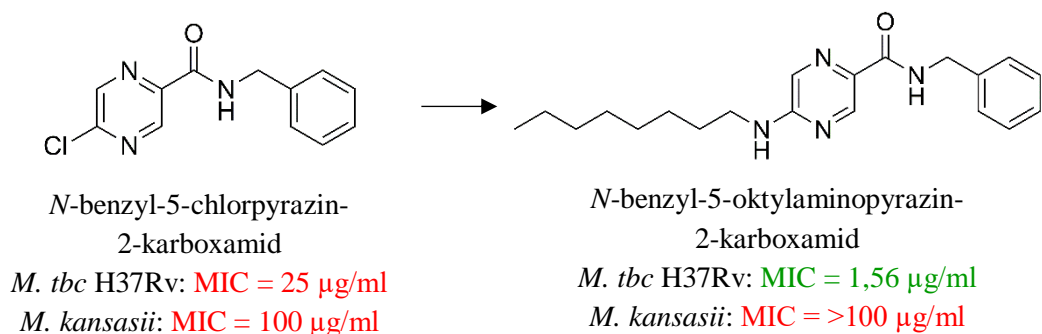
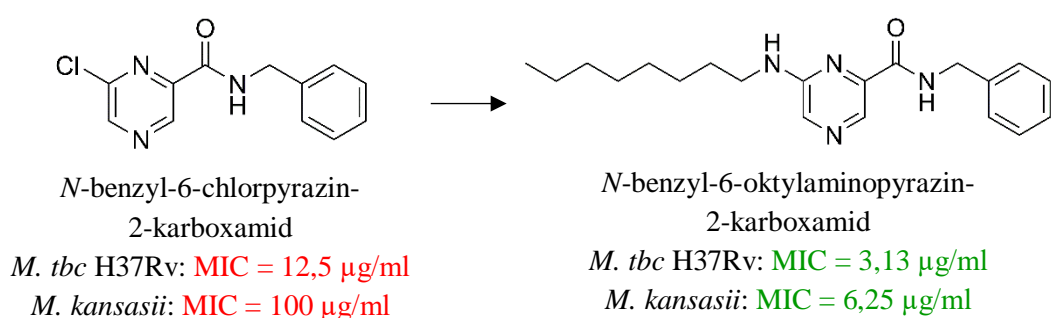
• Série 6

V rámci této série byla studována antimykobakteriální aktivity 3-, 5- a 6-alkylamino derivátů *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu. V případě 5- a 6-isomerů byly pozorovány obdobné vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou, tj. nárůst aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv s prodlužujícím se alkylovým řetězcem. Kulminace aktivity byla pozorována u derivátů s hexyl až oktylamino skupinou. Hodnoty MIC se pohybovaly v rozmezí 1,56 – 3,13 µg/ml, tj. 4,6 – 20 µmol/l, čímž výrazně převyšovaly aktivitu PZA (MIC = 12,5 µg/ml, tj. 102 µmol/l) Substituce v poloze 3 vedla k neaktivním sloučeninám (MIC > 100 µg/ml).

Je zajímavé, že ve srovnání s analogicky substituovanými *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy došlo v případě 5-isomerů prodloužením spojovacího řetězce mezi fenylovým jádrem a amidovým dusíkem ke ztrátě aktivity vůči *Mycobacterium kansasii*. Naopak 6-isomery vykazaly slibnou aktivitu blízkou se v případě nejaktivnějšího derivátu *N*-benzyl-6-oktylaminopyrazin-2-karboxamidu (MIC = 6,25 µg/ml, tj. 18 µmol/l) aktivitě INH (MIC = 1,56 µg/ml, tj. 11 µmol/l).

Vedlejší produkty nevykázaly výraznější aktivitu vůči testovaným kmenům. Žádný z připravených derivátů nebyl aktivní vůči testovaným kmenům *Mycobacterium avium*.

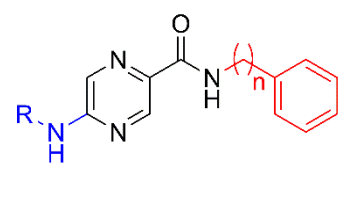
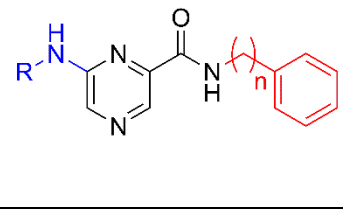
Všechny finální sloučeniny byly dále testovány z hlediska aktivity vůči rezistentním kmenům *Mycobacterium tuberculosis* (kompletní výsledky viz příloha P6). V případě 5- a 6-isomerů byl pozorován nárůst aktivity s prodlužujícím se alkylovým řetězcem kulminujícím u derivátů s hexyl až oktylamino skupinou. Hodnoty MIC se ve většině případů pohybovaly v rozmezí od 4 do 16 $\mu\text{mol/l}$, tj. hodnotami srovnatelným či převyšujícími aktivitu INH (MIC = 16 – 32 $\mu\text{mol/l}$). Pouze *N*-benzyl-3-butylaminopyrazin-2-karboxamid vykázal zanedbatelnou aktivitu vůči testovaným kmenům (MIC = 125 – 250 $\mu\text{mol/l}$), ostatní 3-alkylamino deriváty byly neaktivní (MIC \geq 1000 $\mu\text{mol/l}$).



• **Série 7**

U dříve publikovaných derivátů vedla náhrada alifatické alkylamino skupiny za cykloalkylamino skupinu ke ztrátě antimykobakteriální aktivity^{213; 214}, což bylo částečně pozorováno i v případě cykloalkylamino derivátů *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu, viz **Tabulka 10**.

Tabulka 10: Přehled aktivit derivátů substituovaných v poloze 5- respektive 6-cykloalkylamino skupinou.

	n	R	MIC (µg/ml)	
			<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^a	<i>Mycobacterium kansasii</i> ^b
	0	-C ₆ H ₁₁	6,25 (21)	6,25 (21)
	0	-C ₇ H ₁₃	1,56 (5)	>100
	0	-C ₈ H ₁₅	>100	>100
	1	-C ₆ H ₁₁	>100	>100
	1	-C ₇ H ₁₃	100	>100
	1	-C ₈ H ₁₅	>100	>100
	0	-C ₆ H ₁₁	12,5/25 (42/84)	12,5 (42)
	0	-C ₇ H ₁₃	12,5 (40)	12,5 (40)
	0	-C ₈ H ₁₅	3,13 (10)	12,5 (39)
	1	-C ₆ H ₁₁	12,5 (40)	12,5 (40)
	1	-C ₇ H ₁₃	12,5 (39)	12,5 (39)
	1	-C ₈ H ₁₅	12,5 (37)	>100
PZA			12,5 (102)	>100
INH			0,2 (1,5)	6,25 (46)

^a H37Rv CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 235/80. Hodnoty v závorkách udávají MIC vztaženou na molekulovou hmotnost připravených derivátů (µmol/l).

Substituce chloru za cykloalkylamino skupinu vedla v případě 6-isomerů k mírnému zvýšení aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve srovnání s výchozí látkou, nicméně v případě 5-isomerů byl pozorován spíše pokles, případně ztráta aktivity.

V případě 5-cyklohexyl a 5-cykloheptyl substituce zůstala zachována aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv výrazně převyšující aktivitu PZA, nicméně zavedením methylenové skupiny mezi fenylové jádro a amidovou skupinu vedlo ke ztrátě aktivity. V případě 6-cykloalkylamino derivátů zůstala zachovaná aktivita převyšující aktivitu PZA jak v případě *N*-fenyly, tak *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů. U většiny z těchto derivátů byla navíc pozorována aktivita vůči *Mycobacterium kansasii* srovnatelná s INH

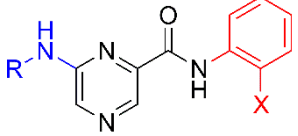
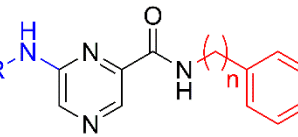
Ze všech připravených derivátů vykázal aktivitu vůči *Mycobacterium avium* CNCTC My 152/73 srovnatelnou s INH (MIC = 6,25 µg/ml, tj. 46 µmol/l) pouze 6-cykloheptylamino-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamid (MIC = 12,5 µg/ml, tj. 40 µmol/l). Ostatní deriváty byly neaktivní.

Antifungální a antibakteriální aktivita

Antifungální a antibakteriální aktivita byla testována s využitím metodik popsaných v kapitole 4.4.2 a 4.4.3. Žádný z připravených derivátů nevykázal aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím. V případě antifungální aktivity byla u části látek pozorována pouze zanedbatelná aktivita vůči *Trichophyton mentagrophytes* 445 (MIC ≥ 125 µmol/l).

Z hlediska antibakteriální aktivity se jako nejslibnější jevíly 6-cykloheptyl- a 6-cyklooktyl-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidy, které vykázaly aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* H5996/08 a *Staphylococcus epidermidis* H6966/08) srovnatelnou s použitými standardy, viz **Tabulka 11**. Jediný derivát ze série 4 vykazující slabou aktivitou vůči *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 byl 6-hexylaminopyrazin-2-karboxamid (MIC = 62,5 µmol/l).

Tabulka 11: Přehled derivátů s nejvyšší antibakteriální aktivitou.

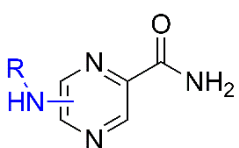
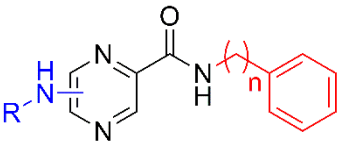
Struktura	X/n	R	MIC (µmol/l)					
			SA		MRSA		SE	
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	-H	-C ₄ H ₉	125	125	250	250	250	250
	-H	-C ₅ H ₁₁	31,3	125	31,3	31,3	15,6	31,3
	-H	-C ₆ H ₁₃	250	>500	7,81	62,5	7,81	31,3
	-H	-C ₇ H ₁₅	250	>500	7,81	15,6	7,81	31,3
	1	n-C ₆ H ₁₃	31,3	500	31,3	500	31,3	500
	1	n-C ₈ H ₁₇	3,9	3,9	31,3	500	62,5	>500
	0	-C ₇ H ₁₃	7,81	7,81	7,81	7,81	3,9	3,9
	0	-C ₈ H ₁₅	1,95	1,95	7,81	7,81	0,98	0,98
	1	-C ₇ H ₁₃	62,5	62,5	>500	>500	31,25	31,25
	1	-C ₈ H ₁₅	15,62	15,62	500	500	250	250
Penicilin G			0,49	0,98	62,5	125	125	250
Ciprofloxacin			0,24	0,49	250	500	250	250
Bacitracin			7,81	7,81	7,81	31,25	15,62	31,25
Neomycin-sulfát			1,95	3,9	3,9	7,81	15,62	15,62

Antivirová aktivita

Antivirová aktivita byla hodnocena u látek ze série 5 a 6 pomocí metodik popsaných v **P6**. Současně s antivirovou aktivitou byla hodnocena i cytotoxicita látek na různé buněčné linie (viz **P5**).

a P6, a kapitola 4.4.5). Z široké škály testovaných DNA a RNA virů byla pozorována mírná aktivita pouze v sérii 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazin-2-karboxamidů a to vůči viru chřipky A/H1N1 (A/PR/8), přičemž nejvyšší aktivitu vykázal *N*-benzyl-5-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid ($EC_{50} = 1,1 \mu\text{mol/l}$). Jako standardy byly použity nukleozin ($EC_{50} = 0,011 \mu\text{mol/l}$), zanamivir ($EC_{50} = 4,0 \mu\text{mol/l}$), amantadin a rimantadin ($EC_{50} = 100 \mu\text{mol/l}$, respektive $20 \mu\text{mol/l}$). *N*-benzyl-5-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid navíc vykázal aktivitu vůči RSV ($EC_{50} = 8,9 \mu\text{mol/l}$) srovnatelnou se standardem (ribavirin, $EC_{50} = 5,8 - 10 \mu\text{mol/l}$).

Tabulka 12: Cytotoxicita vybraných látek na HepG2.

Struktura	n	R	IC ₅₀ (μmol/l)	SI*
	-	5-C ₇ H ₁₅	>250	>4,7
	-	5-C ₈ H ₁₇	>250	>10,0
	-	6-C ₈ H ₁₇	161,0	25,8
	0	6-C ₈ H ₁₇	30,7	3,2
	0	5-C ₆ H ₁₁	>100 (121,2)	>4,7 (5,7)
	0	5-C ₇ H ₁₃	48,7	9,7
	0	6-C ₇ H ₁₃	19,3	0,5
	0	6-C ₈ H ₁₅	18,5	2,0
	1	6-C ₆ H ₉	102,0	2,5
PZA			>1 × 10 ⁴	>98,1

* Hodnoty SI vypočítané pro *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (IC₅₀/MIC v μmol/l).

Cytotoxicita

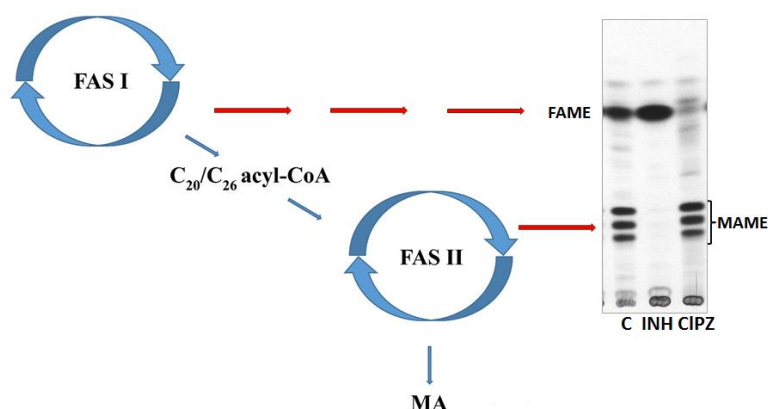
Současně s hodnocením antivirové aktivity probíhalo i hodnocení cytotoxicity na následujících buněčných liniích: CrFK, HEL, HeLa a Vero. Výsledky byly vyjádřeny pomocí koncentrací způsobujících minimální změny v buněčné morfologii (MCC) či CC₅₀. S výjimkou *N*-benzyl-5-oktylamino-pyrazin-2-karboxamidu žádná z testovaných látek nebyla cytotoxická na testovaných buněčných liniích (MCC nebo CC₅₀ > 100 μmol/l).

Pouze část látek s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou byla testována z hlediska cytotoxicity na HepG2, viz **Tabulka 12**. Díky omezené rozpustnosti v testovacím mediu nebylo možné u některých látek stanovit přesné hodnoty IC₅₀. Nicméně ani při nejvyšších koncentracích dosažených při ředění látek nebyl pozorován cytotoxický efekt na HepG2 buňky. Pouze série 4, tj. 5-/6-alkylamino-pyrazin-2-karboxamidy vykázaly nízkou toxicitu na HepG2 buňkách. Z dalších testovaných derivátů vykázal pouze 5-cykloheptyl-*N*-fenzylpyrazin-2-karboxamid hodnotu SI blížíci se 10.

5.2.5 Hodnocení vlivu vybraných sloučenin na syntézu mastných a mykolových kyselin a dalších složek mykobakteriální buněčné stěny

Při návrhu možného mechanismu účinku alkylamino derivátů byla pozornost primárně směřována na jeden z mechanismů účinku PZA a to inhibici synthasy mastných kyselin (FAS I). FAS I je klíčový enzym v syntéze mastných kyselin³⁶ a je propojen s komplexem FAS II, který spotřebovává C_{20}/C_{26} acyl-CoA produkovaný FAS I za vzniku mykolových kyselin, viz **Obrázek 13**. Inhibice FAS I byla pozorována i v případě jednoduchých derivátů PZA jako je například 5-Cl-PZA. Na základě výsledků dockingové studie (viz kapitola 5.2.3) byla jako možný mechanismus účinku 5- a 6-alkylamino derivátů *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu navržena inhibice InhA, tj. klíčového enzymu komplexu FAS II³⁶.

Obrázek 13: Syntéza mastných a mykolových kyselin – propojení FAS I a FAS II.*



* Inhibice FAS I se projevuje jako deplece či pokles obsahu FAME, jak bylo pozorováno na snímku v případě CIPZ = 5-Cl-PZA. Inhibice FAS II vede ke kumulaci FAME a depleci MAME, jak bylo pozorováno na snímku v případě INH. C = kontrola.

V rámci měsíční stáže na Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě autorka této disertační práce studovala vliv deseti vybraných derivátů PZA (včetně alkylamino derivátů diskutovaných v této disertační práci) na syntézu mykolových a mastných kyselin v *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (metodika popsána v kapitole 4.4.4). Testovány byly tyto deriváty:

- 6-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid (**1**, série 4)
- *N*-fenyl-6-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid (**2**, série 5)
- *N*-(2-chlorfenyl)-6-heptylamino-pyrazin-2-karboxamid (**3**, série 5)
- *N*-benzyl-6-heptylamino-pyrazin-2-karboxamid (**4**, série 6)
- *N*-benzyl-5-oktylamino-pyrazin-2-karboxamid (**5**, série 6)
- 3-(4-methylbenzylamino)pyrazin-2-karboxamid (**6**)

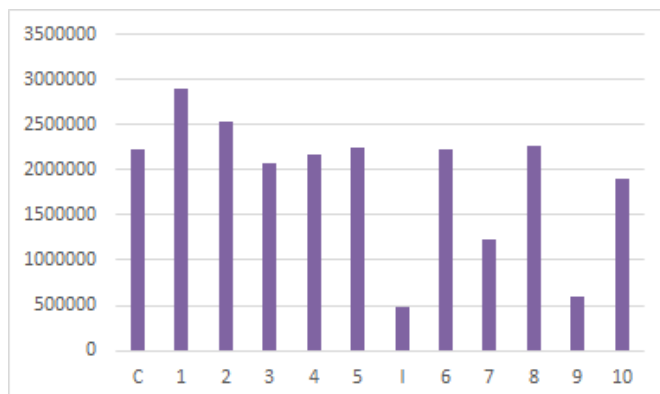
- 5-heptylamino-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril (**7**)
- 5-chlor-*N*-(5-chlor-2-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid (**8**)²⁴²
- kyselina 4-(5-chlorpyrazin-2-karboxamido)-2-hydroxybenzoová (**9**)²⁴²
- *N*-fenyl-5-hexylaminopyrazin-2-karboxamid (**10**)²⁵⁰

Sloučeniny byly vybrány na základě antimykobakteriální aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Látky **1** – **5** byly syntetizovány autorkou, **6** a **7** Mgr. Jand'ourkem a **8** – **10** doktorem Zitkem^{242; 250}. Mastné a mykolové kyseliny byly izolovány z *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra po kultivaci s testovanou látkou a ¹⁴C-značeným octanem sodným. Po extrakci byly tyto následně methylovány přídatkem methyljodidu na odpovídající methylestery mastných kyselin (FAME) a methylestery mykolových kyselin (MAME), separovány pomocí TLC a vizualizovány autoradiograficky. Jako standard byl použit inhibitor InhA INH a v případě kontroly byly mykobakterie kultivovány pouze v médiu s radioaktivní značkou. Kromě MAME a FAME byl sledován i vliv testovaných látek na syntézu dalších složek mykobakteriální buněčné stěny, a to fosfatidylinositol mannosidů (PIMs), trehalóza monomykolátů (TMM) a dimykolátů (TDM). Kultivace a značení mykobakterií probíhaly stejně jako v případě stanovení MAME a FAME, nicméně izolace a následná separace těchto složek se lišila použitými rozpouštědly.

• Inhibice syntézy mastných a mykolových kyselin

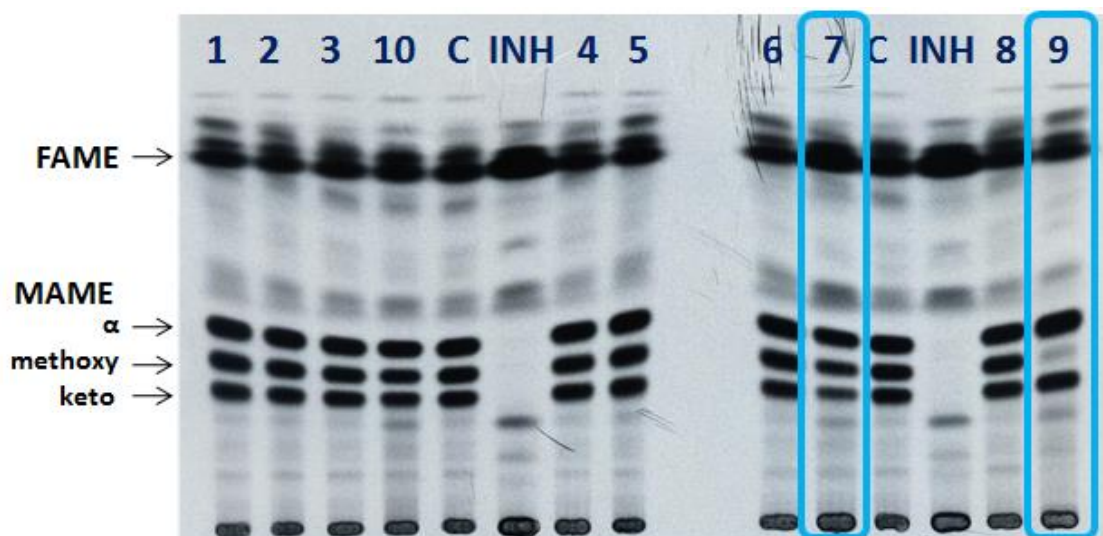
Žádný z testovaných alkylamino derivátů (**1** – **5**, **10**) neovlivňoval syntézu mastných a mykolových kyselin, nicméně v případě sloučenin **7** a **9** byla pozorována změna v množství izolovaných FAME a MAME (viz **Obrázek 14** a **Graf 1**).

Graf 1: Celkový obsah FAME a MAME izolovaných z *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra po kultivaci s testovanými látkami ve srovnání s INH a kontrolou.*



* Hodnoty na ose y udávají počet rozpadů radionuklidu za minutu (dpm), součet FAME a MAME. I = INH, C = kontrola. V případě sloučeniny 7 a 9 pozorován pokles celkového obsahu FAME a MAME.

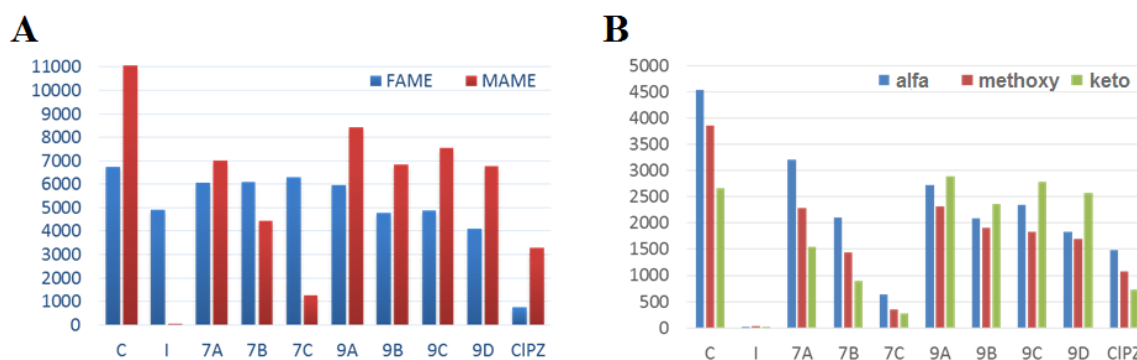
Obrázek 14: Analýza MAME/FAME izolovaných z *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra po kultivaci s testovanými látkami 1 – 10.*



* Látky a INH testovány při koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. C = kontrola. V případě látky 7 pozorována kumulace FAME a pokles obsahu MAME, u látky 9 pozorován pokles FAME a selektivně pokles methoxymykolových kyselin.

Stejně jako v případě INH docházelo při kultivaci mykobakterií s látkou 7 ke kumulaci mastných kyselin (nárůst FAME) a inhibici syntézy mykolových kyselin (pokles MAME). Z tohoto důvodu byla jako možný mechanismus účinku navržena inhibice InhA závislá na koncentraci látky 7, viz **Graf 2** a **Obrázek 15**.

Graf 2: Poměr FAME/MAME (A), respektive poměr jednotlivých MAME (B) při různých koncentracích látky 7 a 9.

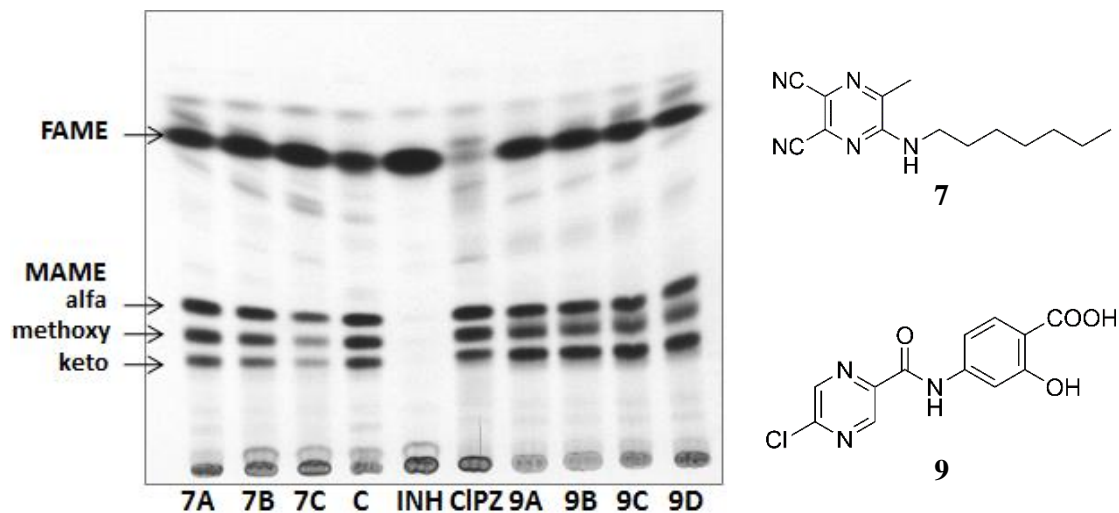


Hodnoty na ose y udávají počet rozpadů radionuklidu za minutu (dpm). C = kontrola, I = INH v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$, CIPZ = 5-Cl-PZA v koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace: 7A – 5 $\mu\text{g/ml}$, 7B – 10 $\mu\text{g/ml}$, 7C – 20 $\mu\text{g/ml}$; 9A – 1 $\mu\text{g/ml}$, 9B – 2 $\mu\text{g/ml}$, 9C – 5 $\mu\text{g/ml}$ a 9D – 7 $\mu\text{g/ml}$.

U látky číslo 9 byl mimo pokles MAME pozorován i pokles FAME, poměr FAME/MAME byl obdobný jako v případě 5-Cl-PZA (inhibitor FAS I), viz **Graf 2** a **Obrázek 15**. Proto byla, jako možný mechanismus účinku, navržena inhibice FAS I. Mimo pokles FAME a MAME byla pozorována i změna poměru jednotlivých mykolových kyselin (α , methoxy a keto). Konkrétně se

jednalo o pokles methoxymykolových kyselin (nejsou esenciální, ale jsou důležité z hlediska virulence), což odpovídá inhibici syntasy methoxy mykolových kyselin 3 (MmaA3³⁶).

Obrázek 15: Analýza FAME a MAME izolovaných z *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra po kultivaci s látkami 7 a 9 v různých koncentracích.*



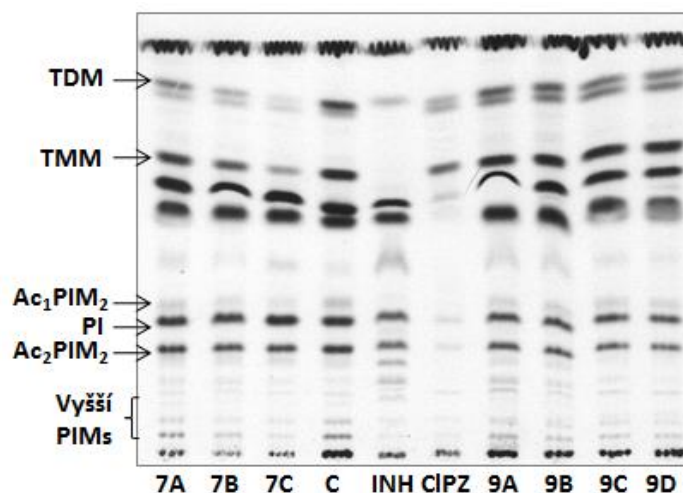
* C = kontrola, I = INH v koncentraci 5 µg/ml, CIPZ = 5-Cl-PZA v koncentraci 25 µg/ml. Koncentrace: 7A – 5 µg/ml, 7B – 10 µg/ml, 7C – 20 µg/ml; 9A – 1 µg/ml, 9B – 2 µg/ml, 9C – 5 µg/ml a 9D – 7 µg/ml.

- **Inhibice syntézy TMM, TDM a PIMs**

Jelikož syntéza mykolových kyselin je spojena se syntézou TMM, TDM a PIMs²⁸, byl pozorován pokles množství těchto derivátů pouze v případě sloučenin 7 a 9, viz **Obrázek 16**.

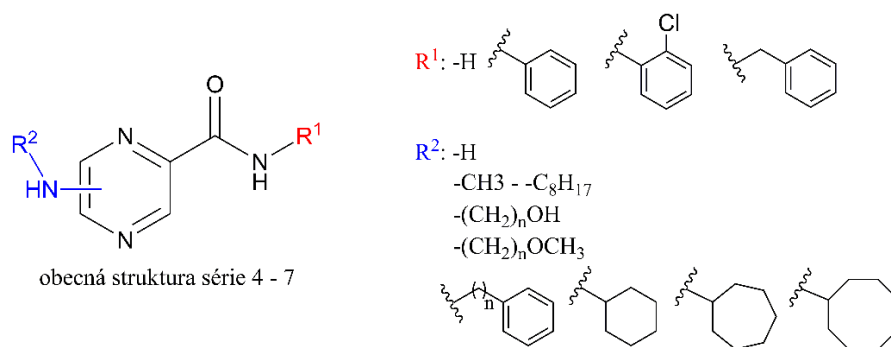
Stejně jako v případě INH docházelo při kultivaci mykobakterií s látkou 7 k poklesu koncentrace TMM a TDM a částečně i PIMs (koncentrační závislost). V případě látky 9 byl pozorován pokles všech sledovaných složek podobně, jako tomu bylo v případě kultivace s 5-Cl-PZA.

Obrázek 16: Analýza TMM, TDM a PIMs izolovaných z *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra po kultivaci s látkami 7 a 9.



C = kontrola. CIPZ = 5-Cl-PZA v koncentraci 25 $\mu\text{g/ml}$, INH v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace: 7A – 5 $\mu\text{g/ml}$, 7B – 10 $\mu\text{g/ml}$, 7C – 20 $\mu\text{g/ml}$; 9A – 1 $\mu\text{g/ml}$, 9B – 2 $\mu\text{g/ml}$, 9C – 5 $\mu\text{g/ml}$ a 9D – 7 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.6 SAR



V rámci všech sérií alkylamino derivátů (včetně sérií publikovaných doktorem Zitkem²⁵⁰ a Mgr. Jand'ourkem²⁴⁸) byly pozorovány podobné vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou:

- Substituce chloru za alkylamino skupinu s delším alifatickým řetězcem (-C₅H₁₁ – -C₈H₁₇) vede ke zvýšení aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
 - Aktivita závisí na lipofilitě a narůstá s prodlužujícím se alkylovým řetězcem.
 - Kulminace aktivity u derivátů s heptyl až oktylamino skupinou.
 - Pozorováno i v případě rezistentních kmenů.
- 6-Alkylamino deriváty obecně méně tolerují modifikace alifatického řetězce.
- 5-Alkylamino deriváty *N*-fenyropyrazin-2-karboxamidu netolerují substituce objemným substituentem na fenylovém jádře v poloze 2.
- Zavedení alkylamino skupiny do polohy 3 vede k neaktivním derivátům (MIC ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$).

- Modifikace alkylového řetězce:
 - Terminální methoxy či hydroxy skupina vede ke ztrátě či poklesu aktivity úměrnému poklesu lipofility.
 - Náhrada části alifatického alkylu za fenyl vede ke ztrátě či výraznému poklesu aktivity.
 - Náhrada alifatického alkylu za cykloalkyl vede k mírnému poklesu aktivity, nárůstu aktivity vůči Gram-pozitivním bakteriím a nárůstu cytotoxicity na HepG2.
- Zavedení methylenové skupiny mezi fenylové jádro a amidovou skupinu vede k:
 - Mírnému poklesu aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
 - V případě 5-alkylamino derivátů ke ztrátě aktivity vůči *Mycobacterium kansasii*.
 - V případě 6-alkylamino derivátů k nárůstu aktivity vůči *Mycobacterium kansasii* (narůstající s délkou alkylového řetězce).

5.2.7 Závěr

V případě alkylamino derivátů byl potvrzen pozitivní vliv prodlužování alkylového řetězce na antimykobakteriální aktivitu. Jako nejslibnější se zdají být oktylalkylamino deriváty odvozené od 5-Cl-PZA respektive 6-Cl-PZA, které kromě selektivity a dobré aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv vykazaly i nízkou cytotoxicitu na HepG2.

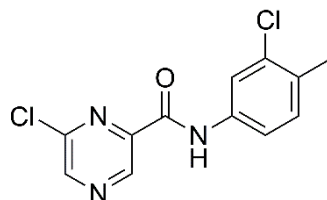
Navržený mechanismus účinku alkylamino derivátů spočívající v inhibici syntézy mastných respektive mykolových kyselin nebyl potvrzen. Otázkou tedy zůstává skutečný mechanismus účinku těchto látek. Na základě krystalografické struktury RpsA, tj. specifického cíle POA, bylo zjištěno, že C5 a C6 pyrazinového jádra nehrají zásadní roli na vazbě POA do RpsA a přinášejí tak možnost modifikace POA. Teoreticky pro vazbu připravených derivátů do RpsA a inhibici trans-translace svědčí i fakt, že 3-alkylamino deriváty nevykázaly antimykobakteriální aktivitu. Další práce by tedy mohla být zaměřena na studium inhibice trans-translace prostřednictvím alkylamino derivátů a přípravu derivátů s alkylamino substitucí v poloze 5- či 6- na pyrazinu a modifikovanou karboxylovou skupinou ve smyslu reverzibilních derivátů (například estery pyrazin-2-karboxylové kyseliny).

6 ZÁVĚR

Problematika tuberkulózy stále představuje závažný problém obzvláště v rozvojových zemích. Hledání nových antituberkulotik je důležité především z důvodu zvyšujícího se počtu pacientů infikovaných kmeny rezistentními vůči antituberkulotikům první a druhé linie, respektive pacientů současně infikovaných HIV.

V rámci teoretické části této disertační práce je popsán současný stav tuberkulózy, epidemiologická situace ve světě a v České republice, a také faktory ztěžující léčbu tohoto onemocnění (rezistence, HIV koinfekce). Dále byly popsány jednotlivé terapeutické režimy a podán přehled běžně užívaných antituberkulotik, léčiv nově zavedených do klinické praxe i potenciálních léčiv nacházejících se v různých fázích vývoje. Jedním z možných přístupů při hledání nových léčiv je modifikace struktury klinicky používané látky. V rámci této disertační práce byla pozornost zaměřena na antituberkulotikum první linie pyrazinamid. Diskutovány byly teorie možného mechanismu účinku pyrazinamidu, pyrazinkarboxylové kyseliny a derivátů připraveným jednoduchou obměnou karboxylové skupiny, či substitucí pyrazinového jádra. Poznání mechanismu účinku těchto látek může významnou měrou přispět k racionálnímu vývoji nových antituberkulotik.

Náplní vlastní experimentální práce byla syntéza derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny. Konkrétně byly připraveny tři série *N*-benzyl a *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů (53 derivátů) substituovaných jak na pyrazinovém, tak fenylovém jádře převážně lipofilními substituenty. Tyto série navazovaly na dříve připravené anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny s dobrou antimykobakteriální aktivitou. Na základě studia vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou byla potvrzená vhodnost substituce elektron-akceptorovou skupinou do polohy *meta* a elektron-donorovou skupinou do polohy *para* na fenylovém jádře. Dosažené závěry byly ve shodě s dříve popsanými SAR u anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny připravených pracovní skupinou prof. Doležala. Nejslibnějším derivátem byl 6-chlor-*N*-(3-chlor-4-methylfenyl)pyrazin-2-karboxamid (příloha **P3**, derivát **13**), který kromě antimykobakteriální aktivity převyšující pyrazinamid vykázal též nízkou toxicitu vůči HepG2.



6 chlor-*N* (3-chlor-4-methylfenyl)pyrazin-2 karboxamid (**P3-13**)

Mycobacterium tuberculosis H37Rv: MIC = 3,13 µg/ml

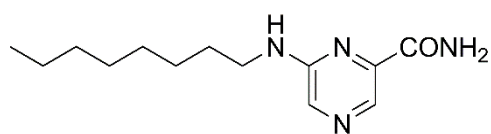
HepG2: IC50 > 250 µmol/l

SI > 22.54

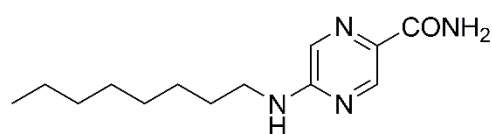
Předlohou pro látky série 4 – 7 se stal 5-chlorpyrazin-2-karboxamid, tj. derivát pyrazinamidu se známých mechanismem účinku. Deriváty byly připraveny substitucí chloru za alkylamino a fenyalkylamino skupinu. Posléze byly připraveny odpovídající polohové isomery, sloučeniny se zachovanou alkylamino substitucí a modifikovanou karboxamidovou skupinou následované deriváty s modifikovaným alkylovým řetězcem. Celkově bylo připraveno 70 alkylamino, fenyalkylamino a cykloalkylamino derivátů pyrazinamidu, *N*-fenyl či *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu. Ve všech sériích se vyskytovaly deriváty se slibnou aktivitou vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv srovnatelnou s aktivitou isoniazidu, či výrazně převyšující aktivitu pyrazinamidu. Část látek též vykazala aktivitu vůči atypickým mykobakteriím srovnatelnou s isoniazidem. Vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou byly diskutovány:

- S prodlužujícím se alkylovým řetězcem narůstala i aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, která kulminovala převážně u derivátů s heptyl či oktylamino substitucí. Dlouhý alkylový řetězec pravděpodobně usnadňuje penetraci sloučeniny přes mykobakteriální buněčnou stěnu.
- Modifikace alkylového řetězce měla obecně negativní vliv na antimykobakteriální aktivitu související pravděpodobně s poklesem lipofilyty těchto derivátů.
- Substituce do polohy 3 vede k neaktivním derivátům.

Většina testovaných látek byla selektivní vůči mykobakteriím. Stran antifungální a antibakteriální aktivity byla pozorována pouze aktivita vůči Gram-pozitivním bakteriím srovnatelná či převyšující aktivitu použitých standardů a to v případě cykloalkylamino derivátů. Antivirová či herbicidní aktivita byla zjištěna pouze v ojedinělých případech. Alkylamino deriváty byly studovány z hlediska inhibice synthasy mastných kyselin I či enoyl-ACP reduktázy. Aktivita vůči těmto enzymům nicméně nebyla potvrzena.



6-oktylamino-2-pyridinylkarboxamid (**P4-2i**)
M. tbc H37Rv: MIC = 1,56 µg/ml
 HepG2: IC₅₀ = 161 µmol/l
 SI = 25,8



5-oktylamino-2-pyridinylkarboxamid (**P4-1i**)
M. tbc H37Rv: MIC = 6,25 µg/ml
 HepG2: IC₅₀ > 250 µmol/l
 SI > 10.0

Závěrem by bylo vhodné podotknout, že určení přesné krystalografické struktury ribosomálního proteinu S1 (RpsA), tj. specifického cíle pyrazinkarboxylové kyseliny, výraznou měrou přispívá k studiu možných modifikací pyrazinového jádra. Na základě orientace pyrazinkarboxylové kyseliny do RpsA bylo zjištěno, že uhlíky C5 a C6 nehrají zásadní roli při vazbě kyseliny do RpsA a mohou být dále substituovány. Jako výhodná se jeví substituce lipofilní

skupinou (dlouhým alkylem), která by usnadnila penetraci pyrazinkarboxylové kyseliny přes mykobakteriální buněčnou stěnu. Z tohoto důvodu alkylamino deriváty pyrazin-2-karboxmidu představují slibnou skupinu látek z hlediska dalších modifikací struktury (například příprava reverzibilních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny typu esterů se zachovanou alkylamino substitucí v poloze 5, respektive 6).

7 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

PŘEHLED PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI:

- P1** **SERVUSOVÁ, B.**, D. EIBINOVÁ, M. DOLEŽAL, V. KUBÍČEK, P. PATEROVÁ, M. PEŠKO, K. KRÁĀOVÁ. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2012**, 17(11), 13183-13198. [ISSN 1420-3049]. IF₂₀₁₁ = 2.386.
Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění všech výchozích látek a finálních derivátů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Hlavní autorka textu.
- P2** **SERVUSOVÁ, B.**, J. VOBICKOVÁ, P. PATEROVÁ, V. KUBÍČEK, J. KUNEŠ, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23(12), 3589-3591. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₁ = 2.554.
Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění substituovaných *N*-benzyl-5-chloropyrazin-2-karboxamidů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Hlavní autorka textu.
- P3** ZITKO, J., **B. SERVUSOVÁ-VANÁSKOVÁ**, P. PATEROVÁ, L. NAVRÁTILOVÁ, F. TREJTNAR, J. KUNEŠ, M. DOLEŽAL. Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Papers*, **2016**, 70(5), 649-657. [ISSN (Print) 0366-6352]. IF₂₀₁₄ = 1.468.
Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění výchozích látek a finálních derivátů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Podíl na přípravě textu.
- P4** **SERVUSOVÁ, B.**, P. PATEROVÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. KUBÍČEK, R. KUČERA, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, 24(2), 450-453. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₂ = 2.338.
Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění výchozích látek a finálních derivátů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Hlavní autorka textu.
- P5** **SERVUSOVA-VANASKOVA, B.**, P. PATEROVA, V. GARAJ, J. MANDIKOVA, J. KUNEŠ, L. NAESSENS, P. JÍLEK, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Synthesis and antimicrobial evaluation of 6-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Biology & Drug Design*, **2015**, 86(4), 674-681. [ISSN 1747-0285]. IF₂₀₁₃ = 2.507.

Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění výchozích látek a finálních derivátů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Hlavní autorka textu.

- P6** **SERVUSOVA-VANASKOVA, B.,** O. JANDOUREK, P. PATEROVA, J. KORDULAKOVA, M. PLEVAKOVA, V. KUBICEK, R. KUCERA, V. GARAJ, L. NAESSENS, J. KUNES, M. DOLEZAL, J. ZITKO. Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *MedChemComm*, **2015**, 6(7), 1311-1317. [ISSN 2040-2503]. IF₂₀₁₃ = 2.626.

Podíl autorky: Syntéza, izolace a přečištění výchozích látek (*N*-benzyl-5-chlorpyrazin-2-karboxamid a *N*-benzyl-6-chlorpyrazin-2-karboxamid) a odpovídajících 5-alkylamino a 6-alkylamino derivátů, příprava vzorků na biologické testování, analýza dat. Hlavní autorka textu.

PŘEHLED DALŠÍCH PUBLIKACÍ:

DOLEŽAL, M., J. VOBICKOVÁ, **B. SERVUSOVÁ**, P. PATEROVÁ Aminopyrazinoic acid esters as potential antimycobacterial drugs. *Česká a Slovenská farmacie: časopis České farmaceutické společnosti a Slovenské farmaceutické společnosti*, **2013**, 62(2), 84-88. [ISSN 1803-6597].

ZITKO, J., **B. SERVUSOVÁ**, P. PATEROVÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. KUBÍČEK, R. KUČERA, V. HRABCOVÁ, J. KUNEŠ, O. SOUKUP, M. DOLEŽAL. Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, **2013**, 18(12), 14807-14825. [ISSN 1420-3049]. IF₂₀₁₂ = 2.428.

ZITKO, J., **B. SERVUSOVÁ**, A. JANOUTOVÁ, P. PATEROVA, J. MANDÍKOVÁ, V. GARAJ, M. VEJSOVÁ, J. MAREK, M. DOLEŽAL. Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23(1), 174-183. [ISSN 0968-0896]. IF₂₀₁₃ = 2.951.

Univerzita Karlova v Praze. DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; JANDOUREK, O.; **SERVUSOVÁ-VAŇÁSKOVÁ B.** Substituted 2-(2-phenylhydrazinyl)pyrazine, process for its preparation, its use and a pharmaceutical composition containing the same. WO 2016/095877 A1: **2016**

Univerzita Karlova v Praze. DOLEŽAL, M.; ZITKO, J.; JANDOUREK, O.; **SERVUSOVÁ-VAŇÁSKOVÁ B.** Substituovaný 2-(2-fenylhydrazinyl)pyrazin, způsob jeho přípravy, jeho použití a farmaceutický přípravek ho obsahující. PV 2014-925.

PŘEDNÁŠKY:

SERVUSOVÁ B., ZITKO J., PATEROVÁ P., KRÁĚOVÁ K., DOLEŽAL M. Development of new antimycobacterial derivatives of pyrazinamide. 3rd Postgraduate and 1st Postdoctoral Conference FaF UK, Hradec Králové, Czech Republic, 29. – 30. 1. 2013.

SERVUSOVÁ B., MANDÍKOVÁ J., PATEROVÁ P., KUBÍČEK V., KUČERA R., DOLEŽAL M., ZITKO J. Pyrazinamide: Insight into antimycobacterial activity of selected 6-alkylamino derivatives. 3rd Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Pula, Italy, 27. – 29. 9. 2013, Book of Abstracts, P-35.

VAŇÁSKOVÁ B., ZITKO J., PATEROVÁ P., DOLEŽAL M. Alkylamino derivatives of *N*-phenylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. 5th Postgraduate and 3rd Postdoctoral Conference FaF UK, Hradec Králové, Czech Republic, 3. – 4. 2. 2015, Book of Abstracts P24-25.

PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ:

SERVUSOVÁ B.; EIBINOVÁ, D.; DOLEŽAL, M.; KLEMENTOVÁ, M.; KRÁĚOVÁ, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides. 4th EuCheMS Chemistry Congress, Prague, Czech Republic, 26. – 30. 8. 2012, Book of Abstracts, P-1346, in: Chemické Listy, 2012, vol. 106, s. 257–1425. [ISSN 1213-7103]

SERVUSOVÁ B.; EIBINOVÁ, D.; DOLEŽAL, M.; VEJSOVÁ, M.; PATEROVÁ, P.; KRÁĚOVÁ, K. Synthesis and Biological Evaluation of Substituted *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamides. 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMIC 2012, Berlin, Germany, 2. – 6. 9. 2012, in: ChemMedChem, 2012, P-176. [ISSN 1860-7179]

SERVUSOVÁ B.; EIBINOVÁ, D.; DOLEŽAL, M.; KLEMENTOVÁ, M.; KRÁĚOVÁ, K. Study of Biological and Hydrophobic Properties of *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamides. 2nd Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Ljubljana, Slovenia 9. – 11. 9. 2012, Book of Abstracts, P-82.

SERVUSOVÁ B., ZITKO J., PATEROVÁ P., KUBÍČEK V., DOLEŽAL M. Development of new antimycobacterial derivatives of pyrazinamide. 5th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Barcelona, Spain, 10. – 13. 6. 2013, Abstracts book, P-121.

SERVUSOVÁ B., ZITKO J., PATEROVÁ P., KUBÍČEK V., DOLEŽAL M. Syntéza a biologické hodnocení derivátů pyrazinamidu. Konference: 42. Syntéza a analýza léčiv, 2. – 5. 9. 2013, Velké Karlovice, Sborník, P109-110.

SERVUSOVÁ B., JANDOUREK O., MANDÍKOVÁ J., PATEROVÁ P., DOLEŽAL M., ZITKO J. Pyrazinamide: Antimycobacterial activity of selected alkylamino derivatives. 4th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Hradec Králové, 20. – 22. 6. 2014, Book of Abstracts P-83.

SERVUSOVÁ B., MANDÍKOVÁ J., PATEROVÁ P., DOLEŽAL M., ZITKO J. Pyrazinamide: Insight into antimycobacterial activity of selected 6-alkylamino derivatives. 23rd International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMIC 2014, Lisbon, Portugal, 7. – 11. 9. 2014, Book of Abstracts P-365.

ZITKO J., **SERVUSOVÁ B.**, PATEROVÁ P., BUCHTA V., DOLEŽAL M. Synthesis and antimycobacterial evaluation of compounds combining pyrazinamide and 2-amino-4-arylthiazole moiety. 23rd International Symposium on Medicinal Chemistry EFMC-ISMIC 2014, Lisbon, Portugal, 7. – 11. 9. 2014, Book of Abstracts P-366.

SERVUSOVA, B.; JANDOUREK, O.; MANDIKOVA, J.; PATEROVA, P.; HOLAS, O.; DOLEZAL, M.; ZITKO, J. Pyrazinamide derivatives as potential inhibitor of mycobacterial enoyl-ACP reductase. 15th Tetrahedron Symposium – Asian Edition, Challenges in Bioorganic and Organic Medicinal Chemistry, Singapore Expo, Singapore 28. – 31. 10. 2014, Book of Abstracts P2.55.

GRANTY:

- **Grantová agentura Univerzity Karlovy**

Číslo projektu: 710312/B-CH/FaF 2012 – 2014

Řešitel: Mgr. Barbora Servusová

Název projektu: Studium nových potenciálních antituberkulotik odvozených od pyrazinkarboxylové kyseliny.

- **Grantová agentura Univerzity Karlovy**

Číslo projektu: 1594214 B-CH/FaF 2014 – 2016

Řešitel: Mgr. Lucia Semelková

Spoluřešitel: Mgr. Barbora Vaňásková

Název projektu: Počítačem podporované projektování léčiv, syntéza, *in vitro* antimykobakteriální hodnocení nových derivátů pyrazinu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BÁRTŮ, V. Tuberkulóza – Infekční choroba v 21. století. *Medicína pro Praxi*, **2008**, 5(6), 245-248.
2. WHO. Global tuberculosis report 2015 [online]. World Health Organization document no. WHO/HTM/TB/2015.22, 2015. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr15_main_text.pdf?ua=1>](http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr15_main_text.pdf?ua=1).
3. ZHANG, Y. AND W. YEW Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2009**, 13(11), 1320-1330.
4. LONG, R. Drug-resistant tuberculosis. *Canadian Medical Association Journal*, **2000**, 163(4), 425-428.
5. O'BRIEN, R. J. Drug-resistant tuberculosis: etiology, management and prevention. *Seminars in Respiratory Infections*, **1994**, 9(2), 104-112.
6. LI, X.-Z. AND H. NIKAIDO Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, **2004**, 64(2), 159-204.
7. LI, X.-Z. AND H. NIKAIDO Efflux-mediated drug resistance in bacteria - An update. *Drugs*, **2009**, 69(12), 1555-1623.
8. SCIOR, T., I. MENESES MORALES, G. EISELE, S. JAVIER, D. DOMEYER AND S. LAUFER Antitubercular isoniazid and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis—a review. *Archiv der Pharmazie*, **2002**, 335(11), 511-525.
9. RAYNAUD, C., M.-A. LANÉELLE, R. H. SENARATNE, P. DRAPER, G. LANÉELLE AND M. DAFFÉ Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology*, **1999**, 145(6), 1359-1367.
10. LOUW, G., R. WARREN, N. G. VAN PITTIUS, C. MCEVOY, P. VAN HELDEN AND T. VICTOR A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, 53(8), 3181-3189.
11. NJIRE, M., Y. TAN, J. MUGWERU, C. WANG, J. GUO, W. YEW, S. TAN AND T. ZHANG Pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis: Review and update. *Advances in Medical Sciences*, **2016**, 61(1), 63-71.
12. ZHANG, S., J. CHEN, W. SHI, W. LIU, W. ZHANG AND Y. ZHANG Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Microbes & Infections*, **2013**, 2(6), e34.
13. BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, **2003**, 83(1), 91-97.
14. DE ROSSI, E., J. A. AÍNSA AND G. RICCARDI Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiology Reviews*, **2006**, 30(1), 36-52.
15. BÁRTŮ, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Medicína*, **2007**, 9(9), 372-373.
16. RAVIGLIONE, M. C. AND I. M. SMITH XDR tuberculosis—implications for global public health. *New England Journal of Medicine*, **2007**, 356(7), 656-659.
17. WHO. Treatment of tuberculosis: guidelines - 4th edition [online]. World Health Organization, document no. WHO/HTM/TB/2009.420., 2010. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138748/pdf/Bookshelf_NBK138748.pdf>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138748/pdf/Bookshelf_NBK138748.pdf).

18. ANANDAIAH, A., K. DHEDA, J. KEANE, H. KOZIEL, D. A. MOORE AND N. R. PATEL Novel developments in the epidemic of human immunodeficiency virus and tuberculosis coinfection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2011**, 183(8), 987-997.
19. GOLETTI, D., D. WEISSMAN, R. W. JACKSON, N. GRAHAM, D. VLAHOV, R. S. KLEIN, S. S. MUNSIFF, L. ORTONA, R. CAUDA AND A. S. FAUCI Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation. *The Journal of Immunology*, **1996**, 157(3), 1271-1278.
20. WELLS, C. D., J. P. CEGIELSKI, L. J. NELSON, K. F. LASERSON, T. H. HOLTZ, A. FINLAY, K. G. CASTRO AND K. WEYER HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis—the perfect storm. *Journal of Infectious Diseases*, **2007**, 196(Supplement 1), S86-S107.
21. WHO. Global tuberculosis report 2014 [online]. World Health Organization document no. WHO/HTM/TB/2014.08, 2014. Elektronická verze dostupná z [www:<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf>](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf).
22. ÚZIS ČR. Zdravotnická statistika: Tuberkulóza a respirační nemoci 2014 [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2015. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2014>](http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2014).
23. ÚZIS ČR. Zdravotnická statistika: Tuberkulóza a respirační nemoci 2013 [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2014. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2013>](http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2013).
24. ÚZIS ČR. Zdravotnická statistika: Tuberkulóza a respirační nemoci 2000 [online]. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2001. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2000>](http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2000).
25. RYAN, K. J. AND C. G. RAY *Medical microbiology: An introduction to infectious diseases*. New York, McGraw-Hill, 2004. ISBN 0838585299.
26. DUCATI, R. G., A. RUFFINO-NETTO, L. A. BASSO AND D. S. SANTOS The resumption of consumption: a review on tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **2006**, 101(7), 697-714.
27. CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1997**, 1(4), 579-588.
28. CRELLIN, P. K., C.-Y. LUO AND Y. S. MORITA *Metabolism of plasma membrane lipids in mycobacteria and corynebacteria*. INTECH Open Access Publisher, 2013. ISBN 9535109448.
29. VOLLMER, W., D. BLANOT AND M. A. DE PEDRO Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, **2008**, 32(2), 149-167.
30. MCNEIL, M., M. DAFJE AND P. J. BRENNAN Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *Journal of Biological Chemistry*, **1990**, 265(30), 18200-18206.
31. LEE, R., P. BRENNAN AND G. BESRA. *Mycobacterium tuberculosis cell envelope*. In *Tuberculosis*. Berlin Heidelberg: Springer, **1996**, p. 1-27. ISBN 978-3-642-80166-2.
32. ROSE, N. L., G. C. COMPLETO, S.-J. LIN, M. MCNEIL, M. M. PALCIC AND T. L. LOWARY Expression, purification, and characterization of a galactofuranosyltransferase involved in Mycobacterium tuberculosis arabinogalactan biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, 128(20), 6721-6729.
33. MCNEIL, M., M. DAFJE AND P. BRENNAN Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **1991**, 266(20), 13217-13223.

34. BROWN, L., J. M. WOLF, R. PRADOS-ROSALES AND A. CASADEVALL Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, **2015**, 13(10), 620-630.
35. BARRY, C. E., R. E. LEE, K. MDLULI, A. E. SAMPSON, B. G. SCHROEDER, R. A. SLAYDEN AND Y. YUAN Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in Lipid Research*, **1998**, 37(2), 143-179.
36. TAKAYAMA, K., C. WANG AND G. S. BESRA Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**, 18(1), 81-101.
37. YUAN, Y., R. E. LEE, G. S. BESRA, J. T. BELISLE AND C. BARRY Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1995**, 92(14), 6630-6634.
38. HUNTER, R. L., M. R. OLSEN, C. JAGANNATH AND J. K. ACTOR Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, **2006**, 36(4), 371-386.
39. RAJNI, R. N. AND S. MEENA LAXMAN Biosynthesis and virulent behavior of lipids produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An overview. *Biotechnology Research International* **2011**, 2011, 274693.
40. SILVA, C., S. EKIZLERIAN AND R. FAZIOLI Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *The American Journal of Pathology*, **1985**, 118(2), 238.
41. STROHMEIER, G. R. AND M. J. FENTON Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes and Infection*, **1999**, 1(9), 709-717.
42. DANIEL, J., C. DEB, V. S. DUBEY, T. D. SIRAKOVA, B. ABOMOELAK, H. R. MORBIDONI AND P. E. KOLATTUKUDY Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *Journal of Bacteriology*, **2004**, 186(15), 5017-5030.
43. NANDEDKAR, A. K. Comparative study of the lipid composition of particular pathogenic and nonpathogenic species of *Mycobacterium*. *Journal of the National Medical Association*, **1983**, 75(1), 69-74.
44. CHATTERJEE, D. AND K.-H. KHOO Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology*, **1998**, 8(2), 113-120.
45. MORITA, Y. S., C. B. SENA, R. F. WALLER, K. KUROKAWA, M. F. SERNEE, F. NAKATANI, R. E. HAITES, H. BILLMAN-JACOB, M. J. MCCONVILLE AND Y. MAEDA PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, 281(35), 25143-25155.
46. ZHANG, Y., B. HEYM, B. ALLEN, D. YOUNG AND S. COLE The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, **1992**, 358(6387), 591-593.
47. BANERJEE, A., E. DUBNAU, A. QUEMARD, V. BALASUBRAMANIAN, K. S. UM, T. WILSON, D. COLLINS, G. DE LISLE AND W. R. JACOBS JR inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **1994**, 263(5144), 227-229.
48. DESSEN, A., A. QUEMARD, J. S. BLANCHARD, W. R. JACOBS JR AND J. C. SACCHETTIN Crystal structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, **1995**, 267(5204), 1638.

49. BASSO, L. A., R. ZHENG, J. M. MUSSER, W. R. JACOBS AND J. S. BLANCHARD Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *Journal of Infectious Diseases*, **1998**, 178(3), 769-775.
50. CAMPBELL, E. A., N. KORZHEVA, A. MUSTAEV, K. MURAKAMI, S. NAIR, A. GOLDFARB AND S. A. DARST Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, **2001**, 104(6), 901-912.
51. HEEP, M., U. RIEGER, D. BECK AND N. LEHN Mutations in the beginning of the rpoB Gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2000**, 44(4), 1075-1077.
52. WILLIAMS, D., L. SPRING, L. COLLINS, L. MILLER, L. HEIFETS, P. GANGADHARAM AND T. GILLIS Contribution of rpoB mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1998**, 42(7), 1853-1857.
53. TAKAYAMA, K. AND J. O. KILBURN Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1989**, 33(9), 1493-1499.
54. WOLUCKA, B. A., M. R. MCNEIL, E. DE HOFFMANN, T. CHOJNACKI AND P. J. BRENNAN 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**, 269(37), 23328-23335.
55. LEE, R., K. MIKUSOVA, P. BRENNAN AND G. BESRA Synthesis of the arabinose Donor. beta.-d-arabinofuranosyl-1-monophosphoryldecaprenol, development of a basic arabinosyl-transferase assay, and identification of ethambutol as an arabinosyl transferase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117(48), 11829-11832.
56. MIKUSOVA, K., R. A. SLAYDEN, G. S. BESRA AND P. J. BRENNAN Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1995**, 39(11), 2484-2489.
57. PAULIN, L., E. BRANDER AND H. PÖSÖ Specific inhibition of spermidine synthesis in *Mycobacteria* spp. by the dextro isomer of ethambutol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1985**, 28(1), 157-159.
58. SILVE, G., P. VALERO-GUILLEN, A. QUEMARD, M. DUPONT, M. DAFTE AND G. LANEELLE Ethambutol inhibition of glucose metabolism in mycobacteria: a possible target of the drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, 37(7), 1536-1538.
59. TAKAYAMA, K., E. L. ARMSTRONG, K. A. KUNUGI AND J. O. KILBURN Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1979**, 16(2), 240-242.
60. KILBURN, J. AND K. TAKAYAMA Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acid in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1981**, 20(3), 401-404.
61. SREEVATSAN, S., K. E. STOCKBAUER, X. PAN, B. N. KREISWIRTH, S. L. MOGHAZEH, W. R. JACOBS, A. TELENTI AND J. M. MUSSER Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**, 41(8), 1677-1681.
62. GLOBAL ALLIANCE FOR TB DRUG DEVELOPMENT Handbook of anti-tuberculosis agents. *Tuberculosis*, **2008**, 88(2), 85-169.

63. ARBEX, M. A., M. D. C. L. VARELLA, H. R. D. SIQUEIRA AND F. A. F. D. MELLO Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations-part 1: first-line drugs. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, **2010**, 36(5), 626-640.
64. WHO. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis [online]. World Health Organization document no. WHO/HTM/TB/2014.11, 2014. Elektronická verze dostupná z [www:<http://apps.who.int/iris/handle/10665/130918>](http://apps.who.int/iris/handle/10665/130918).
65. GINSBURG, A. S., J. H. GROSSET AND W. R. BISHAI Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, **2003**, 3(7), 432-442.
66. KOTRA, L. P., J. HADDAD AND S. MOBASHERY Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2000**, 44(12), 3249-3256.
67. CARTER, A. P., W. M. CLEMONS, D. E. BRODERSEN, R. J. MORGAN-WARREN, B. T. WIMBERLY AND V. RAMAKRISHNAN Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, **2000**, 407(6802), 340-348.
68. RENGARAJAN, J., C. M. SASSETTI, V. NARODITSKAYA, A. SLOUTSKY, B. R. BLOOM AND E. J. RUBIN The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Molecular microbiology*, **2004**, 53(1), 275-282.
69. BROWN, K. A. AND C. RATLEDGE The effect of p-aminosalicylic acid on iron transport and assimilation in mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1975**, 385(2), 207-220.
70. SHINABARGER, D. L., K. R. MAROTTI, R. W. MURRAY, A. H. LIN, E. P. MELCHIOR, S. M. SWANEY, D. S. DUNYAK, W. F. DEMYAN AND J. M. BUYSSE Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**, 41(10), 2132-2136.
71. JOHANSEN, S. K., C. E. MAUS, B. B. PLIKAYTIS AND S. DOUTHWAITE Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Molecular Cell*, **2006**, 23(2), 173-182.
72. AKBERGENOV, R., D. SHCHERBAKOV, T. MATT, S. DUSCHA, M. MEYER, D. N. WILSON AND E. C. BÖTTGER Molecular basis for the selectivity of antituberculosis compounds capreomycin and viomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, 55(10), 4712-4717.
73. FENG, Z. AND R. G. BARLETTA 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**, 47(1), 283-291.
74. HALOUSKA, S., O. CHACON, R. J. FENTON, D. K. ZINNIEL, R. G. BARLETTA AND R. POWERS Use of NMR metabolomics to analyze the targets of D-cycloserine in mycobacteria: role of D-alanine racemase. *Journal of Proteome Research*, **2007**, 6(12), 4608-4614.
75. BANERJEE, D. AND R. BHATTACHARYYA Isoniazid and thioacetazone may exhibit antitubercular activity by binding directly with the active site of mycolic acid cyclopropane synthase: Hypothesis based on computational analysis. *Bioinformatics*, **2012**, 8(16), 787-789.
76. ALAHARI, A., X. TRIVELLI, Y. GUÉRARDEL, L. G. DOVER, G. S. BESRA, J. C. SACCHETTINI, R. C. REYNOLDS, G. D. COXON AND L. KREMER Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PLoS One*, **2007**, 2(12), e1343.

77. WHO. Model list of essential medicines - 19th list [online]. World Health Organization, 2015. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1>](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/EML_2015_FINAL_amended_NOV2015.pdf?ua=1).
78. HARRIES, A., R. ZACHARIAH AND S. LAWN Providing HIV care for co-infected tuberculosis patients: a perspective from sub-Saharan Africa *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2009**, 13(1), 6-16.
79. D'AMBROSIO, L., R. CENTIS, G. SOTGIU, E. PONTALI, A. SPANEVELLO AND G. B. MIGLIORI New anti-tuberculosis drugs and regimens: 2015 update. *ERJ Open Research*, **2015**, 1(1), 00010-02015.
80. CHHABRA, N., M. ASERI, R. DIXIT AND S. GAUR Pharmacotherapy for multidrug resistant tuberculosis. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, **2012**, 3(2), 98-104.
81. Janssen Pharmaceutica N.V. Quinoline derivatives and their use as mycobacterial inhibitors. VAN GESTEL, J., J. GUILLEMONT, M. VENET, H. POIGNET, L. DECRANE AND D. VERNIER. number WO2004011436 A1: 2004.
82. MATTEELLI, A., A. C. CARVALHO, K. E. DOOLEY AND A. KRITSKI TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiology*, **2010**, 5(6), 849-858.
83. HUITRIC, E., P. VERHASSELT, K. ANDRIES AND S. E. HOFFNER In vitro antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51(11), 4202-4204.
84. ANDRIES, K., P. VERHASSELT, J. GUILLEMONT, H. W. GÖHLMANN, J.-M. NEEFS, H. WINKLER, J. VAN GESTEL, P. TIMMERMAN, M. ZHU AND E. LEE A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, **2005**, 307(5707), 223-227.
85. MAHAJAN, R. Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, **2013**, 3(1), 1-2.
86. KOUL, A., N. DENDOUGA, K. VERGAUWEN, B. MOLENBERGHS, L. VRANCKX, R. WILLEBRORDS, Z. RISTIC, H. LILL, I. DORANGE AND J. GUILLEMONT Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase. *Nature Chemical Biology*, **2007**, 3(6), 323-324.
87. KOUL, A., L. VRANCKX, N. DENDOUGA, W. BALEMANS, I. VAN DEN WYNGAERT, K. VERGAUWEN, H. W. GOHLMANN, R. WILLEBRORDS, A. PONCELET, J. GUILLEMONT, D. BALD AND K. ANDRIES Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. *The Journal of biological chemistry*, **2008**, 283(37), 25273-25280.
88. VAN HEESWIJK, R., B. DANNEMANN AND R. HOETELMANS Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2014**, dku171.
89. SVENSSON, E. M., K. E. DOOLEY AND M. O. KARLSSON Impact of lopinavir-ritonavir or nevirapine on bedaquiline exposures and potential implications for patients with tuberculosis-HIV coinfection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2014**, 58(11), 6406-6412.
90. GURUMURTHY, M., T. MUKHERJEE, C. S. DOWD, R. SINGH, P. NIYOMRATTANAKIT, J. A. TAY, A. NAYYAR, Y. S. LEE, J. CHERIAN AND H. I. BOSHOFF Substrate specificity of the deazaflavin-dependent nitroreductase from

- Mycobacterium tuberculosis responsible for the bioreductive activation of bicyclic nitroimidazoles. *Febs Journal*, **2012**, 279(1), 113-125.
91. MATSUMOTO, M., H. HASHIZUME, T. TOMISHIGE, M. KAWASAKI, H. TSUBOUCHI, H. SASAKI, Y. SHIMOKAWA AND M. KOMATSU OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. *PLoS Medicine*, **2006**, 3(11), e466.
 92. SALIU, O. Y., C. CRISMALE, S. K. SCHWANDER AND R. S. WALLIS Bactericidal activity of OPC-67683 against drug-tolerant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2007**, 60(5), 994-998.
 93. WHO. The use of delamanid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis interim policy guidance 2014 [online]. World Health Organization document no. WHO/HTM/TB/2014.23, 2014. Elektronická verze dostupná z [www:<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137334/1/WHO_HTM_TB_2014.23_eng.pdf?ua=1.>](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137334/1/WHO_HTM_TB_2014.23_eng.pdf?ua=1).
 94. STOVER, C. K., P. WARRENER, D. R. VANDEVANTER, D. R. SHERMAN, T. M. ARAIN, M. H. LANGHORNE, S. W. ANDERSON, J. A. TOWELL, Y. YUAN AND D. N. MCMURRAY A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature*, **2000**, 405(6789), 962-966.
 95. LENAERTS, A. J., V. GRUPPO, K. S. MARIETTA, C. M. JOHNSON, D. K. DRISCOLL, N. M. TOMPKINS, J. D. ROSE, R. C. REYNOLDS AND I. M. ORME Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against Mycobacterium tuberculosis in a series of in vitro and in vivo models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2005**, 49(6), 2294-2301.
 96. SINGH, R., U. MANJUNATHA, H. I. BOSHOFF, Y. H. HA, P. NIYOMRATTANAKIT, R. LEDWIDGE, C. S. DOWD, I. Y. LEE, P. KIM AND L. ZHANG PA-824 kills nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by intracellular NO release. *Science*, **2008**, 322(5906), 1392-1395.
 97. HAVER, H. L., A. CHUA, P. GHODE, S. B. LAKSHMINARAYANA, A. SINGHAL, B. MATHEMA, R. WINTJENS AND P. BIFANI Mutations in genes for the F420 biosynthetic pathway and a nitroreductase enzyme are the primary resistance determinants in spontaneous in vitro-selected PA-824-resistant mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2015**, 59(9), 5316-5323.
 98. DAWSON, R., A. H. DIACON, D. EVERITT, C. VAN NIEKERK, P. R. DONALD, D. A. BURGER, R. SCHALL, M. SPIGELMAN, A. CONRADIE AND K. EISENACH Efficiency and safety of the combination of moxifloxacin, pretomanid (PA-824), and pyrazinamide during the first 8 weeks of antituberculosis treatment: a phase 2b, open-label, partly randomised trial in patients with drug-susceptible or drug-resistant pulmonary tuberculosis. *The Lancet*, **2015**, 385(9979), 1738-1747.
 99. COLE, S. T., R. BROSCH, J. PARKHILL, T. GARNIER, C. CHURCHER, D. HARRIS, S. V. GORDON, K. EIGLMEIER, S. GAS, C. E. BARRY, 3RD, F. TEKAIA, K. BADCOCK, D. BASHAM, D. BROWN, T. CHILLINGWORTH, R. CONNOR, R. DAVIES, K. DEVLIN, T. FELTWELL, S. GENTLES, N. HAMLIN, S. HOLROYD, T. HORNSBY, K. JAGELS, A. KROGH, J. MCLEAN, S. MOULE, L. MURPHY, K. OLIVER, J. OSBORNE, M. A. QUAIL, M. A. RAJANDREAM, J. ROGERS, S. RUTTER, K. SEEGER, J. SKELTON, R. SQUARES, S. SQUARES, J. E. SULSTON, K. TAYLOR, S. WHITEHEAD AND B. G. BARRELL Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, **1998**, 393(6685), 537-544.
 100. FELIPE DOS SANTOS FERNANDES, G., P. HARTMANN JORNADA, C. DE SOUZA, C. MAN CHIN, F. ROGERIO PAVAN AND J. LEANDRO DOS SANTOS Current

- advances in antitubercular drug discovery: Potent prototypes and new targets. *Current Medicinal Chemistry*, **2015**, 22(27), 3133-3161.
101. WORKING GROUP ON NEW TB DRUGS. Drug Pipeline [online]. Working group on new TB drugs, 2016. Elektronická verze dostupná z [www:<http://www.newtbdugs.org/pipeline.php>](http://www.newtbdugs.org/pipeline.php).
 102. LECHARTIER, B., R. C. HARTKOORN AND S. T. COLE In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2012**, 56(11), 5790-5793.
 103. MAKAROV, V., G. MANINA, K. MIKUSOVA, U. MÖLLMANN, O. RYABOVA, B. SAINT-JOANIS, N. DHAR, M. R. PASCA, S. BURONI AND A. P. LUCARELLI Benzothiazinones kill Mycobacterium tuberculosis by blocking arabinan synthesis. *Science*, **2009**, 324(5928), 801-804.
 104. MAKAROV, V., B. LECHARTIER, M. ZHANG, J. NERES, A. M. VAN DER SAR, S. A. RAADSEN, R. C. HARTKOORN, O. B. RYABOVA, A. VOCAT AND L. A. DECOSTERD Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Molecular Medicine*, **2014**, e201303575.
 105. PASCA, M. R., G. DEGIACOMI, A. L. D. J. L. RIBEIRO, F. ZARA, P. DE MORI, B. HEYM, M. MIRRIONE, R. BRERRA, L. PAGANI AND L. PUCILLO Clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in four European hospitals are uniformly susceptible to benzothiazinones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, 54(4), 1616-1618.
 106. IGARASHI, M., N. NAKAGAWA, N. DOI, S. HATTORI, H. NAGANAWA AND M. HAMADA Caprazamycin B, a novel anti-tuberculosis antibiotic, from Streptomyces sp. *The Journal of Antibiotics*, **2003**, 56(6), 580-583.
 107. ISHIZAKI, Y., C. HAYASHI, K. INOUE, M. IGARASHI, Y. TAKAHASHI, V. PUJARI, D. C. CRICK, P. J. BRENNAN AND A. NOMOTO Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *Journal of Biological Chemistry*, **2013**, 288(42), 30309-30319.
 108. TAKAHASHI, Y., M. IGARASHI, T. MIYAKE, H. SOUTOME, K. ISHIKAWA, Y. KOMATSUKI, Y. KOYAMA, N. NAKAGAWA, S. HATTORI AND K. INOUE Novel semisynthetic antibiotics from caprazamycins A–G: caprazene derivatives and their antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, **2013**, 66(3), 171-178.
 109. ENGOHANG-NDONG, J. Antimycobacterial drugs currently in Phase II clinical trials and preclinical phase for tuberculosis treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **2012**, 21(12), 1789-1800.
 110. BOROVIKSKAYA, M. A., S. SHOJI, J. M. HOLTON, K. FREDRICK AND J. H. CATE A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin. *ACS Chemical Biology*, **2007**, 2(8), 545-552.
 111. LEE, R. E., J. G. HURDLE, J. LIU, D. F. BRUHN, T. MATT, M. S. SCHERMAN, P. K. VADDADY, Z. ZHENG, J. QI AND R. AKBERGENOV Spectinamides: a new class of semisynthetic antituberculosis agents that overcome native drug efflux. *Nature Medicine*, **2014**, 20(2), 152-158.
 112. TYAGI, S., N. C. AMMERMAN, S.-Y. LI, J. ADAMSON, P. J. CONVERSE, R. V. SWANSON, D. V. ALMEIDA AND J. H. GROSSET Clofazimine shortens the duration of the first-line treatment regimen for experimental chemotherapy of tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2015**, 112(3), 869-874.
 113. LU, Y., M. ZHENG, B. WANG, L. FU, W. ZHAO, P. LI, J. XU, H. ZHU, H. JIN AND D. YIN Clofazimine analogs with efficacy against experimental tuberculosis and reduced

- potential for accumulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, 55(11), 5185-5193.
114. ZHANG, D., Y. LU, K. LIU, B. LIU, J. WANG, G. ZHANG, H. ZHANG, Y. LIU, B. WANG AND M. ZHENG Identification of less lipophilic riminophenazine derivatives for the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 55(19), 8409-8417.
 115. BOGATCHEVA, E., C. HANRAHAN, B. NIKONENKO, G. DE LOS SANTOS, V. REDDY, P. CHEN, F. BARBOSA, L. EINCK, C. NACY AND M. PROTOPOPOVA Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21(18), 5353-5357.
 116. RIVERS, E. C. AND R. L. MANCERA New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action. *Drug Discovery Today*, **2008**, 13(23), 1090-1098.
 117. KANG, S., R. Y. KIM, M. J. SEO, S. LEE, Y. M. KIM, M. SEO, J. J. SEO, Y. KO, I. CHOI AND J. JANG Lead optimization of a novel series of imidazo [1, 2-a] pyridine amides leading to a clinical candidate (Q203) as a multi-and extensively-drug-resistant anti-tuberculosis agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57(12), 5293-5305.
 118. PETHE, K., P. BIFANI, J. JANG, S. KANG, S. PARK, S. AHN, J. JIRICEK, J. JUNG, H. K. JEON AND J. CECHETTO Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature Medicine*, **2013**, 19(9), 1157-1160.
 119. ZHANG, M., C. SALA, N. DHAR, A. VOCAT, V. K. SAMBANDAMURTHY, S. SHARMA, G. MARRINER, V. BALASUBRAMANIAN AND S. T. COLE In vitro and in vivo activities of three oxazolidinones against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2014**, 58(6), 3217-3223.
 120. ALFFENAAR, J., T. VAN DER LAAN, S. SIMONS, T. VAN DER WERF, P. VAN DE KASTEELE, H. DE NEELING AND D. VAN SOOLINGEN Susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to a potentially less toxic derivate of linezolid, PNU-100480. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, 55(3), 1287-1289.
 121. ZHU, T., S. O. FRIEDRICH, A. DIACON AND R. S. WALLIS Population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the bactericidal activities of sutezolid (PNU-100480) and its major metabolite against intracellular *Mycobacterium tuberculosis* in ex vivo whole-blood cultures of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2014**, 58(6), 3306-3311.
 122. WALLIS, R. S., W. JAKUBIEC, V. KUMAR, G. BEDARIDA, A. SILVIA, D. PAIGE, T. ZHU, M. MITTON-FRY, L. LADUTKO AND S. CAMPBELL Biomarker-assisted dose selection for safety and efficacy in early development of PNU-100480 for tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, 55(2), 567-574.
 123. WALLIS, R. S., R. DAWSON, S. O. FRIEDRICH, A. VENTER, D. PAIGE, T. ZHU, A. SILVIA, J. GOBEY, C. ELLERY AND Y. ZHANG Mycobactericidal activity of sutezolid (PNU-100480) in sputum (EBA) and blood (WBA) of patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, **2014**, 9(4), e94462.
 124. LEE, R. E., M. PROTOPOPOVA, E. CROOKS, R. A. SLAYDEN, M. TERROT AND C. E. BARRY Combinatorial lead optimization of [1, 2]-diamines based on ethambutol as potential antituberculosis preclinical candidates. *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2003**, 5(2), 172-187.
 125. PROTOPOPOVA, M., C. HANRAHAN, B. NIKONENKO, R. SAMALA, P. CHEN, J. GEARHART, L. EINCK AND C. A. NACY Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1, 2-ethylenediamines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2005**, 56(5), 968-974.

126. TAHLAN, K., R. WILSON, D. B. KASTRINSKY, K. ARORA, V. NAIR, E. FISCHER, S. W. BARNES, J. R. WALKER, D. ALLAND AND C. E. BARRY SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2012**, 56(4), 1797-1809.
127. LI, K., L. A. SCHURIG-BRICCIO, X. FENG, A. UPADHYAY, V. PUJARI, B. LECHARTIER, F. L. FONTES, H. YANG, G. RAO AND W. ZHU Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57(7), 3126-3139.
128. REDDY, V. M., L. EINCK, K. ANDRIES AND C. A. NACY In vitro interactions between new antitubercular drug candidates SQ109 and TMC207. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, 54(7), 2840-2846.
129. REDDY, V. M., T. DUBUISSON, L. EINCK, R. S. WALLIS, W. JAKUBIEC, L. LADUKTO, S. CAMPBELL AND C. A. NACY SQ109 and PNU-100480 interact to kill *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2012**, dkr589.
130. HEINRICH, N., R. DAWSON, J. DU BOIS, K. NARUNSKY, G. HORWITH, A. J. PHIPPS, C. A. NACY, R. E. AARNOUTSE, M. J. BOEREE AND S. H. GILLESPIE Early phase evaluation of SQ109 alone and in combination with rifampicin in pulmonary TB patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2015**, 70(5), 1558-1566.
131. DE STEENWINKEL, J. E., R. E. AARNOUTSE, G. J. DE KNEGT, M. T. TEN KATE, M. TEULEN, H. A. VERBRUGH, M. J. BOEREE, D. VAN SOOLINGEN AND I. A. BAKKER-WOUDENBERG Optimization of the rifampin dosage to improve the therapeutic efficacy in tuberculosis treatment using a murine model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2013**, 187(10), 1127-1134.
132. GUMBO, T., A. LOUIE, M. R. DEZIEL, W. LIU, L. M. PARSONS, M. SALFINGER AND G. L. DRUSANO Concentration-dependent *Mycobacterium tuberculosis* killing and prevention of resistance by rifampin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51(11), 3781-3788.
133. BOEREE, M. J., A. H. DIACON, R. DAWSON, K. NARUNSKY, J. DU BOIS, A. VENTER, P. P. PHILLIPS, S. H. GILLESPIE, T. D. MCHUGH AND M. HOELSCHER A dose-ranging trial to optimize the dose of rifampin in the treatment of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **2015**, 191(9), 1058-1065.
134. FLETCHER, H. A. AND L. SCHRAGER TB vaccine development and the End TB Strategy: importance and current status. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2016**, 110(4), 212-218.
135. HEIFETS, L. AND P. LINDHOLM-LEVY Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *American Review of Respiratory Disease*, **1992**, 145(5), 1223-1225.
136. MITCHISON, D. A. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. *Tubercle*, **1985**, 66(3), 219-225.
137. ZHANG, Y., W. SHI, W. ZHANG AND D. MITCHISON Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiology Spectrum*, **2013**, 2(4), 1-20.
138. MALONE, L., A. SCHURR, H. LINDH, D. MCKENZIE, J. KISER AND J. WILLIAMS The effect of pyrazinamide (Aldinamide) on experimental tuberculosis in mice. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, **1952**, 65(5), 511-518.
139. SOLOTOROVSKY, M., F. GREGORY, E. IRONSON, E. BUGIE, R. O'NEILL AND K. PFISTER Pyrazinoic acid amide-An agent active against experimental murine tuberculosis. *Experimental Biology and Medicine*, **1952**, 79(4), 563-565.

140. ZHANG, Y. AND D. MITCHISON The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **2003**, 7(1), 6-21.
141. ZHANG, Y., M. M. WADE, A. SCORPIO, H. ZHANG AND Z. SUN Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2003**, 52(5), 790-795.
142. ZHANG, Y., A. SCORPIO, H. NIKAIDO AND Z. SUN Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Bacteriology*, **1999**, 181(7), 2044-2049.
143. WADE, M. M. AND Y. ZHANG Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**, 58(5), 936-941.
144. COLEMAN, D., S. J. WADDELL AND D. A. MITCHISON Effects of low incubation temperatures on the bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2010**, dkq414.
145. WADE, M. M. AND Y. ZHANG Anaerobic incubation conditions enhance pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*, **2004**, 53(8), 769-773.
146. MIOTTO, P., D. M. CIRILLO AND G. B. MIGLIORI Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness. *CHEST Journal*, **2015**, 147(4), 1135-1143.
147. NGO, S. C., O. ZIMHONY, W. J. CHUNG, H. SAYAHI, W. R. JACOBS AND J. T. WELCH Inhibition of isolated Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51(7), 2430-2435.
148. ZIMHONY, O., J. S. COX, J. T. WELCH, C. VILCHEZE AND W. R. JACOBS, JR. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Medicine*, **2000**, 6(9), 1043-1047.
149. BOSHOF, H. I., V. MIZRAHI AND C. E. BARRY Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of Bacteriology*, **2002**, 184(8), 2167-2172.
150. ZIMHONY, O., C. VILCHÈZE, M. ARAI, J. T. WELCH AND W. R. JACOBS Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51(2), 752-754.
151. SAYAHI, H., O. ZIMHONY, W. R. JACOBS JR, A. SHEKHTMAN AND J. T. WELCH Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to Mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21(16), 4804-4807.
152. SAYAHI, H., K. M. PUGLIESE, O. ZIMHONY, W. R. JACOBS, A. SHEKHTMAN AND J. T. WELCH Analogs of the antituberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to M. tuberculosis fatty acid synthase I. *Chemistry & Biodiversity*, **2012**, 9(11), 2582-2596.
153. SHI, W., X. ZHANG, X. JIANG, H. YUAN, J. S. LEE, C. E. BARRY, H. WANG, W. ZHANG AND Y. ZHANG Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science*, **2011**, 333(6049), 1630-1632.
154. YANG, J., Y. LIU, J. BI, Q. CAI, X. LIAO, W. LI, C. GUO, Q. ZHANG, T. LIN AND Y. ZHAO Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of Mycobacterium tuberculosis by pyrazinamide. *Molecular microbiology*, **2015**, 95(5), 791-803.
155. WITHEY, J. H. AND D. I. FRIEDMAN A salvage pathway for protein synthesis: tmRNA and trans-translation. *Annual Reviews in Microbiology*, **2003**, 57(1), 101-123.

156. DULEBOHN, D., J. CHOY, T. SUNDERMEIER, N. OKAN AND A. W. KARZAI Trans-translation: the tmRNA-mediated surveillance mechanism for ribosome rescue, directed protein degradation, and nonstop mRNA decay. *Biochemistry*, **2007**, 46(16), 4681-4693.
157. KONNO, K., F. M. FELDMANN AND W. MCDERMOTT Pyrazinamide Susceptibility and Amidase Activity of Tubercle Bacilli 1, 2. *American Review of Respiratory Disease*, **1967**, 95(3), 461-469.
158. BOSHOFF, H. I., X. XU, K. TAHLAN, C. S. DOWD, K. PETHE, L. R. CAMACHO, T.-H. PARK, C.-S. YUN, D. SCHNAPPINGER AND S. EHRT Biosynthesis and recycling of nicotinamide cofactors in mycobacterium tuberculosis an essential role for nad in nonreplicating bacilli. *Journal of Biological Chemistry*, **2008**, 283(28), 19329-19341.
159. FOSTER, J. W. AND A. G. MOAT Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiological Reviews*, **1980**, 44(1), 83-105.
160. SHARMA, V., C. GRUBMEYER AND J. C. SACCHETTINI Crystal structure of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis: a potential TB drug target. *Structure*, **1998**, 6(12), 1587-1599.
161. KIM, H., K. SHIBAYAMA, E. RIMBARA AND S. MORI Biochemical characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and inhibition of its activity by pyrazinamide. *PloS One*, **2014**, 9(6), e100062.
162. SHI, W., J. CHEN, J. FENG, P. CUI, S. ZHANG, X. WENG, W. ZHANG AND Y. ZHANG Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis. *Emerging Microbes & Infections*, **2014**, 3(8), e58.
163. SCORPIO, A. AND Y. ZHANG Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, **1996**, 2(6), 662-667.
164. HIRANO, K., M. TAKAHASHI, Y. KAZUMI, Y. FUKASAWA AND C. ABE Mutation in pncA is a major mechanism of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease*, **1998**, 78(2), 117-122.
165. SCORPIO, A., P. LINDHOLM-LEVY, L. HEIFETS, R. GILMAN, S. SIDDIQI, M. CYNAMON AND Y. ZHANG Characterization of pncA mutations in pyrazinamide-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1997**, 41(3), 540-543.
166. ZIMIC, M., P. FUENTES, R. H. GILMAN, A. H. GUTIÉRREZ, D. KIRWAN AND P. SHEEN Pyrazinoic acid efflux rate in Mycobacterium tuberculosis is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis*, **2012**, 92(1), 84-91.
167. SLAMA, N., S. JAMET, W. FRIGUI, A. PAWLIK, D. BOTTAI, F. LAVAL, P. CONSTANT, A. LEMASSU, K. CAM, M. DAFTE, R. BROSCH, N. EYNARD AND A. QUEMARD The changes in mycolic acid structures caused by hadC mutation have a dramatic effect on the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, **2016**, 99(4), 794-807.
168. ZITKO, J. *Deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny jako potenciální antituberkulotika (příprava a studium biologických vlastností)*. Disertační práce Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2011**.
169. ESFAHANIZADEH, M., K. OMIDI, J. KAUFFMAN, A. GUDARZI, S. S. ZAHEDANI, S. AMIDI AND F. KOBARFARD Synthesis and evaluation of new fluorinated anti-tubercular compounds. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2014**, 13(1), 115-126.

170. ZHANG, Y., S. PERMAR AND Z. SUN Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology*, **2002**, 51(1), 42-49.
171. Chongqing Technology and Business University. Polyhalogenated pyrazine carboxamide derivatives and salts, preparation method and application for treating Mycobacterium tuberculosis and multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. JIANG, Y. number CN 103467392: 2013.
172. BISPO, M. D. L. F., R. S. B. GONÇALVES, C. H. D. S. LIMA, L. N. D. F. CARDOSO, M. C. S. LOURENÇO AND M. V. N. DE SOUZA Synthesis and antitubercular evaluation of N-arylpyrazine and N, N'-alkyl-diylpyrazine-2-carboxamide derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2012**, 49(6), 1317-1322.
173. TEWATIA, N., ABIDA AND K. P. NAMDEO Synthesis and antimicrobial activity of pyrazine carboxamide derivatives. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2012**, 4(3), 1794-1798.
174. CHITRE, T., K. ASGAONKAR, P. MINIYAR, A. DHARME, M. ARKILE, A. YEWARE, D. SARKAR, V. KHEDKAR AND P. JHA Synthesis and docking studies of pyrazine-thiazolidinone hybrid scaffold targeting dormant tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**, 26(9), 2224-2228.
175. ALJUFFALI, I. A., C.-F. LIN, C.-H. CHEN AND J.-Y. FANG The codrug approach for facilitating drug delivery and bioactivity. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2016**, 13(9), 1311-1325.
176. IMRAMOVSKÝ, A., S. POLANC, J. VINŠOVÁ, M. KOČEVAR, J. JAMPÍLEK, Z. REČKOVÁ AND J. KAUSTOVÁ A new modification of anti-tubercular active molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, 15(7), 2551-2559.
177. RAWAT, J., P. K. JAIN, V. RAVICHANDRAN AND R. AGRAWAL Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of isoniazid, p-amino salicylic acid and ethambutol. *ARKIVOC*, **2007**, (i), 105-118.
178. CYNAMON, M. H., S. P. KLEMENS, T. S. CHOU, R. H. GIMI AND J. T. WELCH Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1992**, 35(7), 1212-1215.
179. CYNAMON, M. H., R. GIMI, F. GYENES, C. A. SHARPE, K. E. BERGMANN, H. J. HAN, L. B. GREGOR, R. RAPOLU, G. LUCIANO AND J. T. WELCH Pyrazinoic acid esters with broad spectrum in vitro antimycobacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1995**, 38(20), 3902-3907.
180. BERGMANN, K. E., M. H. CYNAMON AND J. T. WELCH Quantitative structure-activity relationships for the in vitro antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1996**, 39(17), 3394-3400.
181. SIMÕES, M. F., E. VALENTE, M. J. R. GÓMEZ, E. ANES AND L. CONSTANTINO Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs: stability, activation and activity against M. tuberculosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, 37(3), 257-263.
182. SEGRETTI, N. D., C. K. SIMÕES, M. F. CORRÊA, V. M. A. FELLI, M. MIYATA, S. H. CHO, S. G. FRANZBLAU AND J. P. DOS SANTOS FERNANDES Antimycobacterial activity of pyrazinoate prodrugs in replicating and non-replicating Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, **2016**, 99, 11-16.
183. KRÁTKÝ, M., J. VINŠOVÁ, E. NOVOTNÁ AND J. STOLAŘÍKOVÁ Salicylanilide pyrazinoates inhibit in vitro multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 53, 1-9.

184. KRÁTKÝ, M., J. VINŠOVÁ, E. NOVOTNÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. WSÓL, F. TREJTNAR, V. ULMANN, J. STOLARÍKOVÁ, S. FERNANDES AND S. BHAT Salicylanilide derivatives block Mycobacterium tuberculosis through inhibition of isocitrate lyase and methionine aminopeptidase. *Tuberculosis*, **2012**, 92(5), 434-439.
185. KRATKY, M., J. VINSOVA AND V. BUCHTA In vitro antibacterial and antifungal activity of salicylanilide pyrazine-2-carboxylates. *Medicinal Chemistry*, **2012**, 8(4), 732-741.
186. MUÑOZ-ELÍAS, E. J. AND J. D. MCKINNEY Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature Medicine*, **2005**, 11(6), 638-644.
187. HIMAJA, M., M. VIJAYA SIMHA, D. MUNIRAJASEKHAR, K. ASIF AND M. MAHIMA Synthesis and evaluation of antitubercular activity of some lamivudine based hybrid drugs. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, **2012**, 3(2), 315-317.
188. PETRELLA, S., N. GELUS-ZIENTAL, A. MAUDRY, C. LAURANS, R. BOUDJELLOUL AND W. SOUGAKOFF Crystal structure of the pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One*, **2011**, 6(1), e15785.
189. ROFFEY, J. Bioisosteres in medicinal chemistry, Technical notes for the medicinal chemist. *Maybridge MedChem*, **1997**, 1, 1-41.
190. DAS, R., G. SHILAKARI ASTHANA, K. A. SURI, D. K. MEHTA AND A. ASTHANA Synthesis and assessment of antitubercular and antimicrobial activity of some novel triazolo and tetrazolo-fused 1, 3, 4-oxadiazole molecules containing pyrazine moiety. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **2015**, 7(10), 806-811.
191. BIOT, C., W. DAHER, C. M. NDIAYE, P. MELNYK, B. PRADINES, N. CHAVAIN, A. PELLET, L. FRAISSE, L. PELINSKI AND C. JARRY Probing the role of the covalent linkage of ferrocene into a chloroquine template. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49(15), 4707-4714.
192. SKIBA, J., A. RAJNISZ, K. N. DE OLIVEIRA, I. OTT, J. SOLECKA AND K. KOWALSKI Ferrocenyl bioconjugates of ampicillin and 6-aminopenicillanic acid—Synthesis, electrochemistry and biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 57, 234-239.
193. RALAMBOMANANA, D. A., D. RAZAFIMAHEFA-RAMILISON, A. C. RAKOTOHOVA, J. MAUGEIN AND L. PELINSKI Synthesis and antitubercular activity of ferrocenyl diaminoalcohols and diamines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16(21), 9546-9553.
194. MAGUENE, G. M., J. JAKHLAL, M. LADYMAN, A. VALLIN, D. A. RALAMBOMANANA, T. BOUSQUET, J. MAUGEIN, J. LEBIBI AND L. PÉLINSKI Synthesis and antimycobacterial activity of a series of ferrocenyl derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46(1), 31-38.
195. VERBITSKIY, E. V., M. S. TOPOROVA, M. I. KODESS, M. A. EZHIKOVA, M. L. ISENOV, M. G. PERVOVA, M. A. KRAVCHENKO, I. D. MEDVINSKIY, S. N. SKORNYAKOV AND G. L. RUSINOV Synthesis, X-ray crystal structure and antimycobacterial activity of enantiomerically pure 1-ethyl-2, 3-dicyano-5-(het) aryl-6-hetaryl-1, 6-dihydropyrazines. *ARKIVOC*, **2014**, (v), 247-270.
196. VERBITSKIY, E. V., P. A. SLEPUKHIN, M. A. KRAVCHENKO, S. N. SKORNYAKOV, N. V. KUNGUROV, G. L. RUSINOV, O. N. CHUPAKHIN AND V. N. CHARUSHIN Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of some new 1-ethyl-5-(hetero) aryl-6-styryl-1, 6-dihydropyrazine-2, 3-dicarbonitriles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, 25(3), 524-528.

197. BYCROFT, M., T. J. HUBBARD, M. PROCTOR, S. M. FREUND AND A. G. MURZIN The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold. *Cell*, **1997**, 88(2), 235-242.
198. DOLEŽAL, M. *Deriváty na jádře substituovaných pyrazinkarboxylových kyselin jako potenciální antituberkulotika a antimykotika*. Disertační práce Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **1996**.
199. PALEK, L. *Deriváty pyrazinamidu jako potenciální antituberkulotika*. Disertační práce Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2009**.
200. KLEIN, B. AND J. BERKOWITZ Pyrazines. I. Pyrazine-N-oxides. Preparation and Spectral Characteristics1. *Journal of the American Chemical Society*, **1959**, 81(19), 5160-5166.
201. FOKS, H. AND J. SAWLEWICZ N-Oxides of 2-pyrazinecarboxylic acid. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **1963**, 21, 429-436.
202. Montedison S.P.A. Process for the preparation of 2-carboxypyrazine 4-oxides. VENTURELLO, C. AND R. D'ALOISIO. number US4866178 A: 1989.
203. ABE, Y., Y. SHIGETA, F. UCHIMARU, S. OKADA AND E. OZASAYAMA. Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. Japan. 1969, 69 12,898. In *Chem. Abstr.* 1969, vol. 71, p. 112979y.
204. MATULENKO, M. A., C.-H. LEE, M. JIANG, R. R. FREY, M. D. COWART, E. K. BAYBURT, S. DIDOMENICO, G. A. GFESSER, A. GOMTSYAN AND G. Z. ZHENG 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl) pyrido [2, 3-d] pyrimidin-4-ylamine: structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13(11), 3705-3720.
205. DOLEŽAL, M., J. HARTL, M. MILETÍN, M. MACHÁČEK AND K. KRÁĚOVÁ Synthesis and photosynthesisinhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chemical Papers*, **1999**, 53(2), 126-130.
206. KUSHNER, S., H. DALALIAN, F. BACH JR, D. CENTOLA, J. SANJURJO AND J. WILLIAMS Experimental chemotherapy of tuberculosis. III. Ethyl mercaptan and related compounds in tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society*, **1955**, 77(5), 1152-1155.
207. OKADA, S., A. KOSASAYAMA, T. KONNO AND F. UCHIMARU Studies on pyrazine derivatives. II. Synthesis, reactions, and spectra of pyrazine N-oxide derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1971**, 19(7), 1344-1357.
208. PALEK, L., J. DVOŘÁK, M. SVOBODOVA, V. BUCHTA, J. JAMPÍLEK AND M. DOLEŽAL Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of 3-arylamino-pyrazine-2, 5-dicarbonitriles. *Archiv der Pharmazie*, **2008**, 341(1), 61-65.
209. AMBROGI, V., P. COZZI, P. SANJUST, L. BERTONE, P. LOVISOLO, G. BRIATICOVANGOSA AND R. ANGELUCCI Anti-lipolytic activity of a series of pyrazine-N-oxides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1980**, 15(2), 157-163.
210. CLAYDEN, J., N. GREEVES, S. WARREN AND P. WOTHERS. *Organic chemistry*. In. Oxford: Oxford University Press, **2001**, p. 276-296. ISBN 0-19-850346-6.
211. FOKS, H. AND W. MANOWSKA Aminomethylation of pyridine-and pyrazinecarbothioamides. V. The Mannich reaction of 6-chloro-and 6-aminopyrazine-2-carbothioamide. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **1975**, 33(1), 55-65.
212. NAKAMURA, A., T. ATAKA, H. SEGAWA, Y. TAKEUCHI AND T. TAKEMATSU Structure-activity relationship of herbicidal 2, 3-dicyano-5-substituted pyrazines. *Agricultural and Biological Chemistry*, **1983**, 47(7), 1555-1560.

213. ZITKO, J., M. DOLEZAL, M. SVOBODOVA, M. VEJSOVA, J. KUNES, R. KUCERA AND P. JILEK Synthesis and antimycobacterial properties of N-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19(4), 1471-1476.
214. ZITKO, J., J. JAMPÍLEK, L. DOBROVOLNÝ, M. SVOBODOVÁ, J. KUNEŠ AND M. DOLEŽAL Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 3-aminopyrazine-2, 5-dicarbonitriles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, 22(4), 1598-1601.
215. CNCTC - Česká národní sbírka typových kultur [online]. Elektronická verze dostupná z [www:<http://apps.szu.cz/cnctc/uvod.php>](http://apps.szu.cz/cnctc/uvod.php).
216. FRANZBLAU, S. G., R. S. WITZIG, J. C. MCLAUGHLIN, P. TORRES, G. MADICO, A. HERNANDEZ, M. T. DEGNAN, M. B. COOK, V. K. QUENZER AND R. M. FERGUSON Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **1998**, 36(2), 362-366.
217. RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, **2012**, 12(9), 12347-12360.
218. RAMSDELL, G. A., W. JOHNSON AND F. EVANS Investigation of resazurin as an indicator of the sanitary condition of milk. *Journal of Dairy Science*, **1935**, 18(11), 705-717.
219. AHMED, S. A., R. M. GOGAL AND J. E. WALSH A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, **1994**, 170(2), 211-224.
220. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65(1-2), 55-63.
221. O'BRIEN, J., I. WILSON, T. ORTON AND F. POGNAN Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, **2000**, 267(17), 5421-5426.
222. NOCIARI, M. M., A. SHALEV, P. BENIAS AND C. RUSSO A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, **1998**, 213(2), 157-167.
223. LOZANO-CHIU, M., M. V. LANCASTER AND J. H. REX Evaluation of a colorimetric method for detecting amphotericin B-resistant Candida isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **1998**, 31(3), 417-424.
224. YAJKO, D. M., J. J. MADEJ, M. V. LANCASTER, C. A. SANDERS, V. L. CAWTHON, B. GEE, A. BABST AND W. K. HADLEY Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **1995**, 33(9), 2324-2327.
225. BARNES, S. AND J. G. SPENNEY Stoichiometry of the NADH-oxidoreductase reaction for dehydrogenase determinations. *Clinica Chimica Acta*, **1980**, 107(3), 149-154.
226. PAGE, B., M. PAGE AND C. NOEL A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *International Journal of Oncology*, **1993**, 3, 473-473.
227. NCCLS *Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast: Approved Standard M27-A*. Wayne, Pennsylvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1997.
228. JONES, R. N. AND A. L. BARRY Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *Journal of Clinical Microbiology*, **1987**, 25(10), 1920-1925.

229. VILCHÈZE, C., F. WANG, M. ARAI, M. H. HAZBÓN, R. COLANGELI, L. KREMER, T. R. WEISBROD, D. ALLAND, J. C. SACCHETTINI AND W. R. JACOBS Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nature Medicine*, **2006**, 12(9), 1027-1029.
230. NAESENS, L., C. E. STEPHENS, G. ANDREI, A. LOREGIAN, L. DE BOLLE, R. SNOECK, J. W. SOWELL AND E. DE CLERCQ Antiviral properties of new arylsulfone derivatives with activity against human betaherpesviruses. *Antiviral Research*, **2006**, 72(1), 60-67.
231. NAESENS, L., E. VANDERLINDEN, E. RÓTH, J. JEKŐ, G. ANDREI, R. SNOECK, C. PANNECOUQUE, E. ILLYÉS, G. BATTÁ AND P. HERCZEGH Anti-influenza virus activity and structure–activity relationship of aglycoristocetin derivatives with cyclobutenedione carrying hydrophobic chains. *Antiviral Research*, **2009**, 82(1), 89-94.
232. VANDERLINDEN, E., F. GÖKTAŞ, Z. CESUR, M. FROEYEN, M. L. REED, C. J. RUSSELL, N. CESUR AND L. NAESENS Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin. *Journal of Virology*, **2010**, 84(9), 4277-4288.
233. University Of South Florida. Tetrazolium compounds for cell viability assays. OWEN, T. C. number US5185450 A: 1993.
234. KRÁTKÝ, M., J. VINŠOVÁ, M. VOLKOVÁ, V. BUCHTA, F. TREJTNAR AND J. STOLARÍKOVÁ Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 50, 433-440.
235. MASAROVICOVA, E. AND K. KRALOVA. *Approaches to measuring plant photosynthesis activity*. In *Handbook of Photosynthesis, Second edition*. CRC Press, **2005**. ISBN 978-1-4200-2787-7.
236. KRALOVA, K., F. SERSEN AND E. SIDOOVA Photosynthesis inhibition produced by 2-alkylthio-6-R-benzothiazoles. *Chemical Papers*, **1992**, 46(5), 348-350.
237. LACROIX, C., T. P. HOANG, J. NOUVEAU, C. GUYONNAUD, G. LAINE, H. DUWOOS AND O. LAFONT Pharmacokinetics of pyrazinamide and its metabolites in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, **1989**, 36(4), 395-400.
238. DOLEŽAL, M., D. KESETOVIC AND J. ZITKO Antimycobacterial evaluation of pyrazinoic acid reversible derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, **2011**, 17(32), 3506-3514.
239. DOLEŽAL, M., J. ZITKO, D. KEŠETOVIČOVÁ, J. KUNEŠ AND M. SVOBODOVA Substituted N-phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Molecules*, **2009**, 14(10), 4180-4189.
240. DOLEŽAL, M., J. ZITKO, Z. OSICKA, J. KUNES, M. VEJSOVA, V. BUCHTA, J. DOHNAL, J. JAMPÍLEK AND K. KRALOVA Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, **2010**, 15(12), 8567-8581.
241. DOLEŽAL, M., J. ZITKO AND J. JAMPÍLEK. *Pyrazinecarboxylic acid derivatives with antimycobacterial activity*. In *Understanding tuberculosis - New approaches to fighting against drug resistance*. Rijeka, Croatia: InTech, **2012**, p. 233-262. ISBN 978-953-307-948-6.
242. ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ, P. PATEROVÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. KUBÍČEK, R. KUČERA, V. HRABCOVÁ, J. KUNEŠ, O. SOUKUP AND M. DOLEŽAL Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, **2013**, 18(12), 14807-14825.

243. DOLEŽAL, M., K. KRÁČOVÁ, F. ŠERŠEŇ AND M. MILETIN The site of action of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acids in the photosynthetic apparatus. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*, **2001**, 26(1), 13-20.
244. CYNAMON, M. H., R. J. SPEIRS AND J. T. WELCH In vitro antimycobacterial activity of 5-chloropyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1998**, 42(2), 462-463.
245. AHMAD, Z., S. TYAGI, A. MINKOWSKI, D. ALMEIDA, E. L. NUERMBERGER, K. M. PECK, J. T. WELCH, A. D. BAUGHN AND W. R. JACOBS Activity of 5-chloropyrazinamide in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis*. *The Indian Journal of Medical Research*, **2012**, 136(5), 808.
246. ERICKSON, A. E. AND P. E. SPOERRI Syntheses in the pyrazine series. The preparation and properties of the pyrazyl halides. *Journal of the American Chemical Society*, **1946**, 68(3), 400-402.
247. Amgen Inc. Composés azotés hétérocycliques convenant comme inhibiteurs de la phosphodiesterase 10. ALLEN, J. R., K. L. ANDREWS, M. J. FROHN, P. E. HARRINGTON, A. J. PICKRELL AND R. M. RZASA. number WO/2011/143129: 2011.
248. JANDOUREK, O., M. DOLEZAL, J. KUNES, V. KUBICEK, P. PATEROVA, M. PESKO, V. BUCHTA, K. KRALOVA AND J. ZITKO New potentially active pyrazinamide derivatives synthesized under microwave conditions. *Molecules*, **2014**, 19(7), 9318-9338.
249. SULLIVAN, T. J., J. J. TRUGLIO, M. E. BOYNE, P. NOVICHENOK, X. ZHANG, C. F. STRATTON, H. J. LI, T. KAUR, A. AMIN, F. JOHNSON, R. A. SLAYDEN, C. KISKER AND P. J. TONGE High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chemical Biology*, **2006**, 1(1), 43-53.
250. ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ, A. JANOUTOVÁ, P. PATEROVA, J. MANDIKOVA, V. GARAJ, M. VEJSOVA, J. MAREK AND M. DOLEŽAL Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2015**, 23(1), 174-183.

9 SEZNAM PŘÍLOH

- P1** **SERVUSOVÁ, B., D. EIBINOVÁ, M. DOLEŽAL, V. KUBÍČEK, P. PATEROVÁ,**
Str. 113 **M. PEŠKO, K. KRÁĀOVÁ.** Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides:
Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2012**, 17(11), 13183-13198. [ISSN
1420-3049]. IF₂₀₁₁ = 2.386.
- P2** **SERVUSOVÁ, B., J. VOBICKOVÁ, P. PATEROVÁ, V. KUBÍČEK, J. KUNEŠ,**
Str. 131 **M. DOLEŽAL, J. ZITKO.** Synthesis and antimycobacterial evaluation of
N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry
Letters*, **2013**, 23(12), 3589-3591. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₁ = 2.554.
- P3** **ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ-VANÁSKOVÁ, P. PATEROVÁ, L.**
Str. 143 **NAVRÁTILOVÁ, F. TREJTNAR, J. KUNEŠ, M. DOLEŽAL.** Design, synthesis and
anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides.
Chemical Papers, **2016**, 70(5), 649-657. [ISSN (Print) 0366-6352]. IF₂₀₁₄ = 1.468.
- P4** **SERVUSOVÁ, B., P. PATEROVÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. KUBÍČEK, R. KUČERA,**
Str. 161 **M. DOLEŽAL, J. ZITKO.** Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and
antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2014**,
24(2), 450-453. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₂ = 2.338.
- P5** **SERVUSOVA-VANASKOVA, B., P. PATEROVA, V. GARAJ, J. MANDIKOVA,**
Str. 179 **J. KUNEŠ, L. NAESSENS, P. JÍLEK, M. DOLEŽAL, J. ZITKO.** Synthesis and
antimicrobial evaluation of 6-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides.
Chemical Biology & Drug Design, **2015**, 86(4), 674-681. [ISSN 1747-0285].
IF₂₀₁₃ = 2.507.
- P6** **SERVUSOVA-VANASKOVA, B., O. JANDOUREK, P. PATEROVA, J.**
Str. 195 **KORDULAKOVA, M. PLEVAKOVA, V. KUBICEK, R. KUCERA, V. GARAJ, L.**
NAESSENS, J. KUNES, M. DOLEZAL, J. ZITKO. Alkylamino derivatives of
N-benzylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation.
MedChemComm, **2015**, 6(7), 1311-1317. [ISSN 2040-2503]. IF₂₀₁₃ = 2.626.
- P7** **VANASKOVA, B.** Syntéza a biologické hodnocení cykloalkylamino derivátů
Str. 217 *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu. Metodika
hodnocení inhibice syntézy TDM, TMM a PIMs. Nepublikovaná data. **2015**.

PŘÍLOHA P1

SERVUSOVÁ, B., D. EIBINOVÁ, M. DOLEŽAL, V. KUBÍČEK, P. PATEROVÁ, M. PEŠKO, K. KRÁĚOVÁ. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, **2012**, 17(11), 13183-13198. [ISSN 1420-3049]. IF₂₀₁₁ = 2.386.

Article

Substituted *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and Biological Evaluation †

Barbora Servusová ^{1,*}, Drahomíra Eibinová ¹, Martin Doležal ¹, Vladimír Kubíček ², Pavla Paterová ³, Matúš Peško ⁴ and Katarína Kráľová ⁵

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; E-Mails: eibid5aa@faf.cuni.cz (D.E.); dolezalm@faf.cuni.cz (M.D.)

² Department of Biophysics and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; E-Mail: kubicek@faf.cuni.cz

³ Department of Clinical Microbiology, University Hospital, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; E-Mail: pavla.paterova@fnhk.cz

⁴ Department of Ecosozology and Physiotactics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina Ch-2, 84215 Bratislava, Slovakia; E-Mail: matus.pesko@gmail.com

⁵ Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská Dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovakia; E-Mail: kralova@fns.uniba.sk

† Preliminary results related to the topic of this article were presented at The Fifteenth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-15, <https://docs.google.com/viewer?url=http://www.sciforum.net/presentation/599/pdf&chrome=true>), 1–30 November 2011.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: barbora.servusova@faf.cuni.cz; Tel.: +420-495-067-272; Fax: +420-495-512-423.

Received: 22 October 2012; in revised form: 31 October 2012 / Accepted: 2 November 2012 / Published: 6 November 2012

Abstract: A series of twelve amides was synthesized *via* aminolysis of substituted pyrazinecarboxylic acid chlorides with substituted benzylamines. Compounds were characterized with analytical data and assayed *in vitro* for their antimycobacterial, antifungal, antibacterial and photosynthesis-inhibiting activity. 5-*tert*-Butyl-6-chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**12**) has shown the highest antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 6.25 µg/mL), as well as against other mycobacterial strains. The highest antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes*, the most susceptible fungal strain tested, was found for 5-chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)-

pyrazine-2-carboxamide (**2**, MIC = 15.62 $\mu\text{mol/L}$). None of the studied compounds exhibited any activity against the tested bacterial strains. Except for 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamide (**9**, IC₅₀ = 7.4 $\mu\text{mol/L}$) and 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**11**, IC₅₀ = 13.4 $\mu\text{mol/L}$), only moderate or weak photosynthesis-inhibiting activity in spinach chloroplasts (*Spinacia oleracea* L.) was detected.

Keywords: pyrazinamide analogues; lipophilicity determination; *in vitro* antimycobacterial; antifungal and photosynthesis inhibitory activity

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is considered to be one of the most frequent and widespread nowadays infectious diseases especially in developing countries. In 2010, there were about 8.8 million new cases of TB and 1.4 million deaths (including deaths from TB among HIV-positive people) [1]. Anti-TB drug resistance is a major public health problem that threatens progress made in TB care and control worldwide. Particularly dangerous forms of TB are multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) [1]. Furthermore, TB and HIV synergistically influence each other's progress and lead to the increased need of new antituberculars [2].

Pyrazinamide (PZA), a nicotinamide analogue, is one of the most important first-line drugs used in TB-therapy [3]. Along with rifampicin, PZA has sterilizing activity (the ability to kill the semi-dormant mycobacteria) which is a crucial factor in shortening the duration of therapy [4]. PZA, as a prodrug that requires bacterial enzymes to generate the biologically active molecule, enters mycobacterial cell via passive diffusion and it is activated by pyrazinamidase/nicotinamidase (EC 3.5.1.19) to form pyrazinoic acid (POA) [5]. Pyrazinamidase/nicotinamidase is encoded by the *pncA* gene and mutation of this gene is primarily responsible for resistance to PZA [6]. POA's intracellular accumulation lowers pH in mycobacterial cell, thus leading to inhibition of membrane transport and depletion of energy [7]. Otherwise, the demonstration that PZA and POA inhibit *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase-I (FAS-I) in whole-cell and cell-free assays suggests that the disruption might be a consequence of the inhibition of membrane synthesis [8–10]. Reversible binding of both PZA and POA to *M. tuberculosis* FAS-I has been definitively confirmed by Saturation Transfer Difference NMR spectroscopy (STD-NMR), a NMR technique used to characterize ligand–protein interactions [11]. Boshoff *et al.* [12] reported that FAS-I is not the target of PZA. However, FAS-I has been proposed and confirmed as a target of pyrazinamide derivatives, e.g., 5-chloropyrazinamide [8,9]. Finally, another specific target for POA, ribosomal protein S1 (RpsA), has been identified in recent study [13]. RpsA is a vital protein involved in protein translation and the ribosome-sparing process of *trans*-translation and its role in *M. tuberculosis* is multifaceted.

Several pyrazine derivatives were found to possess herbicidal activity summarized in review paper [14]. Many pyrazinamide derivatives inhibited photosynthetic electron transport (PET) in plant chloroplasts [14–17] and they were found to act as photosystem (PS) 2 inhibitors. Using EPR spectroscopy it was found that 5-*tert*-butyl-*N*-(3-hydroxy-4-chlorophenyl)-pyrazine-2-carboxamide and 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(3-fluorophenyl)-pyrazine-2-carboxamide interacted with the D[•]

intermediate, *i.e.*, with the tyrosine radical which is situated at 161th position on D₂ protein occurring on the donor side of PS 2 [18]. Due to this interaction, PET from the oxygen evolving complex to the reaction centre of PS 2 is impaired. However, an experiment with artificial electron donor 1,5-diphenylcarbazide (DPC) with known site of action in Z[•]/D[•] intermediate confirmed that also some members of the PET chain between Z[•]/D[•] intermediate and plastoquinone were partially damaged in the light by these carboxamides. Chlorophyll *a* fluorescence quenching due to treatment of chloroplast suspension with above mentioned pyrazinamides indicated their interaction with pigment-protein complexes in PS 2 [18].

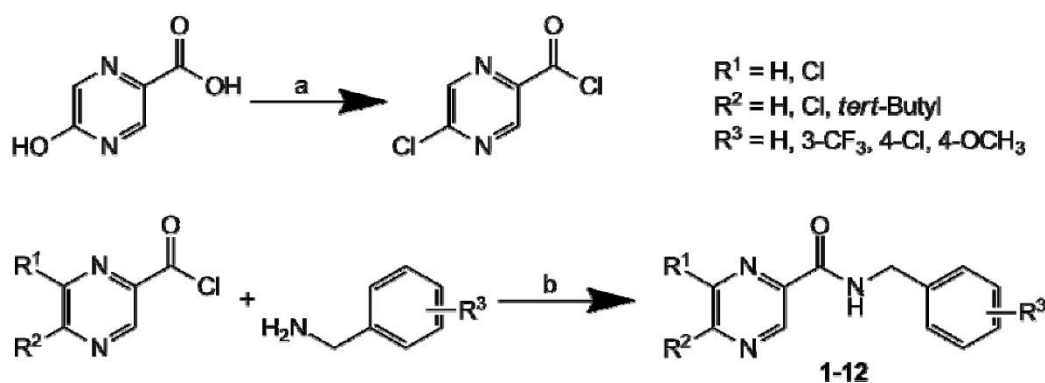
In this study, we focused on binuclear pyrazinamide analogues containing the -CONH-CH₂- bridge, namely on *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides. Earlier studies have shown some interesting anti-mycobacterial activity in a series of substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides [16,19] and become a pattern for substitution of aromatic ring in benzylamines. The aim of this work was to find the structure-activity relationships (SAR) in the series of substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides, *i.e.*, to study the influence of incorporated methylene moiety in the connecting bridge and to continue in the study of the substituent variability influence on the biological activity.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

Synthesis of 5-chloropyrazine-2-carboxylic acid chloride [20] from 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid, as well as synthesis of final compounds **1–12**, is shown in Scheme 1. Condensation of chlorides of 5-chloropyrazine-2-carboxylic [20], 6-chloropyrazine-2-carboxylic [21] and 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic [22] acids with unsubstituted or ring-substituted benzylamines yielded a series of twelve amides. Reactions proceeded under mild conditions, yields of products ranged within 59–91%, and analytical data were fully consistent with the proposed structures. Specific substituents R¹, R² and R³ of individual compounds **1–12** are listed in Table 1.

Scheme 1. Synthesis and structure of the 5-chloropyrazine-2-carbonyl chloride and final products **1–12**.



Reagents: (a) SOCl₂, DMF, toluene; (b) TEA, acetone.

Table 1. Comparison of the calculated lipophilicity ($\log P$, $\text{Clog } P$) with the determined $\log k$ values of the studied compounds **1–12**. IC_{50} values related to PET inhibition in spinach chloroplasts in comparison with the standard 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU).

Compounds	R ¹	R ²	R ³	$\log P$	$\text{Clog } P$	$\log k$	IC_{50} [$\mu\text{mol/L}$]
1	H	Cl	H	1.56	2.3852	0.1862	1623.0
2	H	Cl	3-CF ₃	2.48	3.2682	0.4384	345.8
3	H	Cl	4-Cl	2.12	3.0982	0.4150	604.0
4	H	Cl	4-OCH ₃	1.43	2.3042	0.1655	ND
5	Cl	H	H	1.56	2.3852	0.2002	ND
6	Cl	H	3-CF ₃	2.48	3.2682	0.4507	1207.0
7	Cl	H	4-Cl	2.12	3.0982	0.4335	ND
8	Cl	H	4-OCH ₃	1.43	2.3042	0.1838	ND
9	Cl	(CH ₃) ₃ C	H	3.69	4.2112	1.1215	7.4
10	Cl	(CH ₃) ₃ C	3-CF ₃	4.61	5.0942	1.3638	36.3
11	Cl	(CH ₃) ₃ C	4-Cl	4.25	4.9242	1.3511	13.4
12	Cl	(CH ₃) ₃ C	4-OCH ₃	3.56	4.1302	0.8071	121.6
DCMU	–	–	–	–	–	–	1.9

ND not determined due to their low solubility in the testing medium.

2.2. Lipophilicity

Lipophilicity, one of the most important physicochemical properties of the compound, which seems to be a key factor related to the cell transmembrane transport and other biological processes, can either be determined experimentally or predicted by means of commercially available programmes. In this work $\log P/\text{Clog } P$ values of the compounds **1–12** were calculated using the program CS ChemBioDraw Ultra version 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA) and also measured by means of the RP-HPLC determination of capacity factors k with subsequent calculation of $\log k$. The results are shown in Table 1 and illustrated in Figure 1.

The lowest lipophilicity was shown by 5-chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**4**), while 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**10**) was the most lipophilic compound of this series. Based on $\log k$ values, lipophilicity increased for substituents in pyrazine part in the following order: 5-chloropyrazine < 6-chloropyrazine < 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine. In the case of substituents in the benzyl part of the molecule lipophilicity increased this way: 4-OCH₃ < H < 4-Cl < 4-CF₃. The dependence of the calculated $\text{Clog } P$ values on the measured $\log k$ parameters showed an approximate linearity and the corresponding correlation can be expressed by the following regression equation:

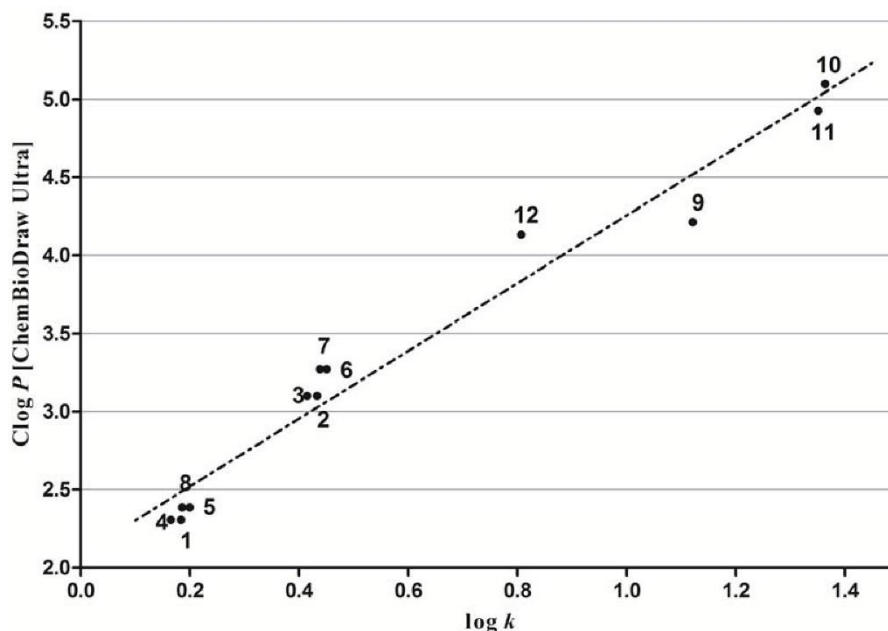
$$\text{Clog } P = 2.170 (\pm 0.131) \log k + 2.086 (\pm 0.096) \quad (1)$$

$$r = 0.9650 \quad s = 0.197 \quad F = 276.1 \quad n = 12$$

The differences between experimentally determined $\log k$ and calculated $\text{Clog } P$ values were observed for 5-chloro and 6-chloro group in pyrazine part. This may be caused by the used calculating program for $\text{Clog } P$, that does not distinguish difference between substituent's lipophilicity in position

C(5) and C(6) in pyrazine part of molecule. Consequently, it can be assumed that $\log k$ values specify lipophilicity within this series of compounds more precisely than calculated $\text{Clog } P$ values.

Figure 1. Plot of calculated $\text{Clog } P$ (CS ChemBioDraw Ultra version 12.0) on experimentally measured $\log k$ parameter. Linear regression parameters.



2.3. Biological Activity

2.3.1. *In Vitro* Antimycobacterial Evaluation

All synthesized compounds were assayed *in vitro* towards *Mycobacterium tuberculosis* and several Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTTs) (see Table 2). The most active derivatives against *M. tuberculosis* were compounds **8**, **10** and **12**, whose minimal inhibition concentrations (MICs) were 6.25 $\mu\text{g/mL}$. These activities were fully comparable with PZA. More importantly, 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**12**) showed significant activity against tested MOTTs, which are unsusceptible to PZA. The vast majority of compounds exhibited only modest antimycobacterial activity expressed as MIC in $\mu\text{g/mL}$, or with respect to the molecular weight of final products in $\mu\text{mol/L}$ (see Table 2).

The obtained results provide some insights into the SAR in this miniseries. With respect to the benzyl part, the most suitable substituents are 4-methoxy and 3-trifluoromethyl groups, especially with disubstitution in the pyrazine moiety. The most significant substitutions in the pyrazine part are chlorine in the C(6) and *tert*-butyl in the C(5) position.

There is no clear dependence between lipophilicity ($\log k$, see Table 1) and antimycobacterial activities in this series, however the most lipophilic compound 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**10**, $\log k = 1.3638$) displayed one of the highest activity against *M. tuberculosis*. On the other hand, 6-chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-

carboxamide (**8**) with the lowest lipophilicity ($\log k = 0.1838$) showed the same activity against *M. tuberculosis* as compound **10** (MIC = 6.25 $\mu\text{g/mL}$).

Table 2. Antimycobacterial and antifungal activity of presented compounds in comparison with standards: pyrazinamide (PZA), isoniazid (INH) and fluconazole (FLU).

Compounds	MIC [$\mu\text{g/mL}$]				TM ^e MIC [$\mu\text{mol/L}$]
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv ^a	<i>M. avium</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c	<i>M. kansasii</i> ^d	
1	25 (100)	100	100	100	125/125
2	25 (79)	25	100	50	15.62/15.62
3	12.5 (44)	100	100	100	125/125
4	25 (90)	100	50	100	250/250
5	12.5 (50)	100	100	50	250/500
6	12.5 (39)	25	100	100	62.5/125
7	12.5 (44)	100	12.5	100	125/125
8	6.25 (22)	100	50	100	500/500
9	25 (82)	25	50	100	250/500
10	6.25 (16)	25	25	25	250/250
11	12.5 (36)	50	50	50	250/500
12	6.25 (18)	12.5	6.25	3.125	250/500
PZA	6.25–12.5 (50–101)	>100	>100	>100	–
INH	1.56 (11)	12.5–25	12.5	12.5	–
FLU	–	–	–	–	1.95/3.91

^a CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 80/72; ^c CNCTC My 152/73; ^d CNCTC My 235/80; ^e TM *Trichophyton mentagrophytes* 445, evaluated after 72 h/120 h.

2.3.2. In Vitro Antifungal Evaluation

The evaluation of *in vitro* antifungal activity of the studied compounds was performed against eight fungal strains. Except for 5-chloro- (**2**) and 6-chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamides (**6**), only weak antifungal activity was found. In comparison with fluconazole (the standard, MIC = 1.95 $\mu\text{mol/L}$ after 72 h) compounds **2** (MIC = 15.62 $\mu\text{mol/L}$) and **6** (MIC = 62.5 $\mu\text{mol/L}$) exhibited moderate *in vitro* antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes* (TM), the most susceptible fungal strain evaluated. For the results see Table 2.

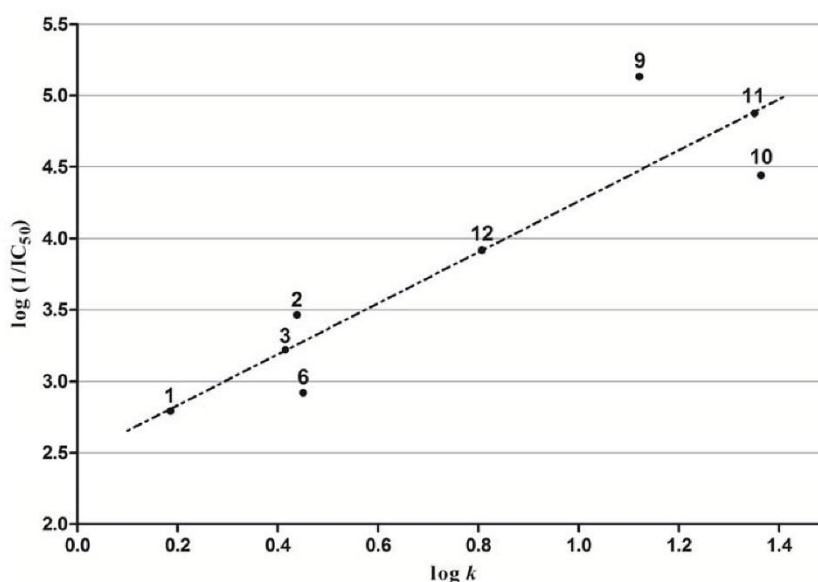
2.3.3. In Vitro Antibacterial Evaluation

All prepared compounds were tested for their *in vitro* antibacterial activity [23,24] against eight bacterial strains, namely against: *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Staphylococcus aureus* H 5996/08–methicilin resistant, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961, *Escherichia coli* CCM 4517, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08 and *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08–ESBL positive. None of the synthesized compounds exhibited any activity against the tested strains.

2.3.4. Inhibition of Photosynthetic Electron Transport (PET)

All studied compounds were evaluated for their photosynthetic electron transport (PET) inhibition in spinach chloroplasts, which was reflected in the inhibition of oxygen evolution rate. The photosynthesis-inhibiting activity of the compounds has been expressed as IC_{50} values. Compounds **4**, **5**, **7** and **8** were not tested due to their low solubility in tested medium. The IC_{50} values varied in the range from 7.4 to 1,623.0 $\mu\text{mol/L}$, see Table 1. The activity of the majority of compounds was moderate or relatively low when compared with the standard 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU, $IC_{50} = 1.9 \mu\text{mol/L}$).

Figure 2. Linear dependence between lipophilicity (expressed as logarithm of retention factor, $\log k$) and photosynthesis-inhibiting activity $\log (1/IC_{50})$ [mol/L]. of synthesized compounds **1–12**.



The most efficient inhibitors of this series were compounds **9** ($IC_{50} = 7.4 \mu\text{mol/L}$) and **11** ($IC_{50} = 13.4 \mu\text{mol/L}$). In general, photosynthesis-inhibiting activity of the studied compounds is dependent on their lipophilicity (compare compounds **9–12**, Table 1). PET inhibition of compounds **1–12** has increased linearly with increasing lipophilicity expressed as $\log P$ or $\log k$ (see Figure 2) and the corresponding correlations can be expressed by the following regression equations:

$$\log (1/IC_{50}) = 1.626 (\pm 0.534) + 0.717 (\pm 0.164) \log P \quad (2)$$

$$r = 0.8722 \quad s = 0.472 \quad F = 19.08 \quad n = 8$$

$$\log (1/IC_{50}) = 2.475 (\pm 0.266) + 1.785 (\pm 0.303) \log k \quad (3)$$

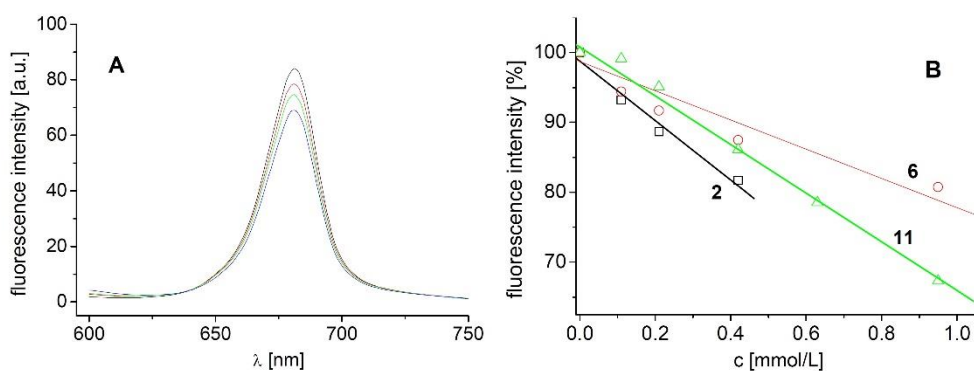
$$r = 0.92358 \quad s = 0.370 \quad F = 34.82 \quad n = 8$$

The results of statistical analysis were improved if $\log k$ instead $\log P$ was used. This finding is in agreement with above mentioned assumption that $\log k$ values specify lipophilicity within this series of

compounds more precisely than calculated $\log P$ values. $\log k$ values of the most active inhibitors were about 1.2.

The effects of the studied compounds on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts were investigated by studying chlorophyll *a* (Chl*a*) fluorescence. Fluorescence emission spectra of Chl*a* in spinach chloroplasts treated with compound **2** are shown in Figure 3A. The decreased intensity of the emission band at 686 nm belonging to the pigment-protein complexes in photosystem 2 [25] suggested PS 2 as the site of action of the studied inhibitors. The extent of perturbation of chlorophyll *a*-protein complexes in the thylakoid membrane was reflected as decreased fluorescence of the pigment (see Figure 3B). Similar decrease of Chl*a* fluorescence in plant chloroplasts was also observed previously after treatment with substituted benzanilides [26] and salicylanilides [27].

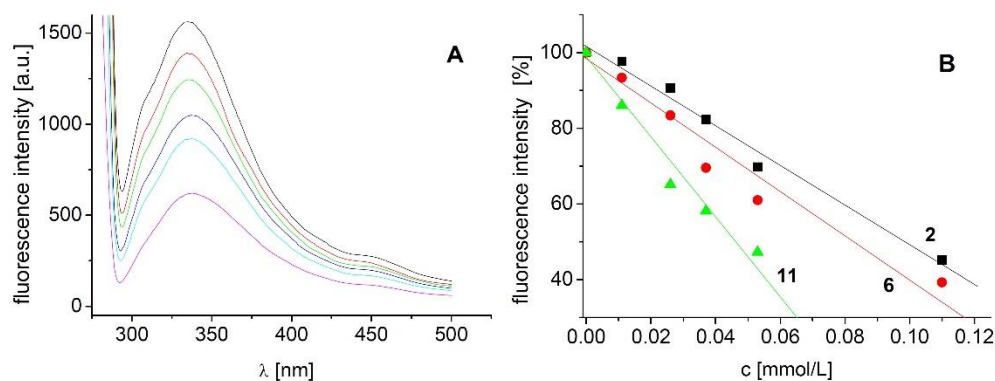
Figure 3. (A) Fluorescence emission spectra of chlorophyll *a* in untreated spinach chloroplasts in the presence of compound **2**: 0, 0.11, 0.21 and 0.42 mmol/L (curves from top to bottom; $\lambda_{\text{ex}} = 436$ nm). (B) Dependence of fluorescence intensity of chlorophyll *a* on concentration of compounds **2** (squares), **11** (triangles) and **6** (circles).



Interaction of the studied compounds with aromatic amino acids, which are present in the proteins of spinach chloroplasts situated in PS 2, was documented by the quenching of their fluorescence at 334 nm. Figure 4 presents fluorescence emission spectra of aromatic amino acids of untreated spinach chloroplasts and of chloroplasts treated with increasing concentrations of compound **6** (see Figure 4A) as well as dependence of fluorescence intensity of chlorophyll *a* on concentration of compounds **2** (squares), **11** (triangles) and **6** (circles) (see Figure 4B). Binding of these compounds to aromatic amino acids occurring in photosynthetic proteins contribute to PET inhibition.

By the addition of DPC, an artificial electron donor acting in Z^*/D^* intermediate on the donor side of PS 2, to chloroplasts treated with the studied compounds in which PET was inhibited at about 80-90%, PET was restored only to 77-88%. This indicates that the site of PET inhibition is situated not only on the donor side of PS 2 in the section between the primary electron donor of PS 2 (H_2O) and Z^*/D^* intermediate but also in the photosynthetic transport chain from P 680 to plastoquinone Q_B occurring on the acceptor side of PS 2. Similar sites of action were determined previously for 5-*tert*-butyl-*N*-(3-hydroxy-4-chlorophenyl)-pyrazine-2-carboxamide and 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(3-fluorophenyl)-pyrazine-2-carboxamide [18].

Figure 4. (A) Fluorescence emission spectra of aromatic amino acids in untreated spinach chloroplasts in presence of compound **6**: 0, 0.011, 0.026, 0.037, 0.053 and 0.11 mmol/L (curves from top to bottom; $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm). (B) Dependence of fluorescence intensity of aromatic amino acids on concentration of compounds **2** (squares), **11** (triangles) and **6** (circles).



3. Experimental

3.1. General

All organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). The reactions were monitored using Merck Silica 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were purified using an automated chromatograph CombiFlash R_f (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040–0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany); gradient elution (hexane/ethyl-acetate), detection wavelength 260 nm, monitor wavelength 280 nm. NMR analysis was performed on Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). IR spectra were recorded in KBr blocks on Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA). Elementary analysis was performed on CE Instruments EA-1110 CHN analyser (CE Instruments, Wigan, UK). Melting points were determined on Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected.

3.2. Synthesis of *N*-Benzylpyrazine-2-carboxamides

To a solution of 6-chloropyrazine-2-carboxylic [21] or 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic [22] acid (0.5 mmol) in dry toluene (20 mL) was added 1.5 equivalent of thionyl chloride (0.75 mmol). The reaction mixture was heated to reflux for about 1 h. Then, the excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with dry toluene *in vacuo*. The crude acyl chloride was dissolved in dry acetone (20 mL) and added dropwise to a stirred solution of the corresponding benzylamine (0.5 mmol) with triethylamine (0.5 mmol) in dry acetone (10 mL). Then, the reaction mixture was stirred at room temperature for about 1 h. The reaction was monitored using TLC with hexane/ethyl acetate 2:1 mixture as eluent. After this time, the solution was evaporated till dryness with silica gel and purified using a flash column chromatography (40 g column, gradient elution hexane/ethyl-acetate).

In the case of 5-chloropyrazine-2-carbonyl chloride [20] synthesis, 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich) was used as starting material. During the reaction with thionyl chloride, the formation of acyl chloride occurs simultaneously with the nucleophilic substitution of the hydroxyl group for chlorine. Dimethylformamide (DMF) was added to the reaction mixture as catalyst [28].

3.3. Data of Prepared Target Compounds

N-Benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamide (**1**). White crystalline compound. Yield: 81%; m.p. 101.9–103.1 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.21 (s, 1H, H3), 8.49 (s, 1H, H6), 7.98 (bs, 1H, NH), 7.40–7.26 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 4.67 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 162.0, 152.1, 144.0, 142.6, 142.4, 137.5, 128.8, 127.8, 127.7, 43.5; IR (cm^{-1}) 3384 (N-H), 1660 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ (247.68): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N; Found: 58.38% C, 4.23% H, 16.89% N.

5-Chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**). White crystalline compound. Yield: 65%; m.p. 91.3–92.7 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.20 (s, 1H, H3), 8.51 (s, 1H, H6), 8.09 (bs, 1H, NH), 7.65–7.40 (m, 4H, H2', H4', H5', H6'), 4.72 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 162.2, 152.3, 144.0, 142.5, 142.3, 138.6, 131.2, 131.1 (q, $J = 32.6$ Hz), 129.3, 124.6 (q, $J = 3.8$ Hz), 124.4 (q, $J = 3.8$ Hz), 123.6 (q, $J = 272.9$ Hz), 43.0; IR (cm^{-1}) 3385 (N-H), 1665 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$ (315.68): 49.46% C, 2.87% H, 13.31% N; Found: 49.51% C, 2.96% H, 13.48% N.

5-Chloro-*N*-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**3**). White crystalline compound. Yield: 79%; m.p. 89.9–91.3 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.20 (s, 1H, H3), 8.50 (s, 1H, H6), 7.98 (bs, 1H, NH), 7.35–7.25 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 4.63 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 162.1, 152.2, 144.0, 142.5, 142.4, 136.1, 133.6, 129.2, 128.9, 42.9; IR (cm^{-1}) 3327 (N-H), 1672 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ (282.13): 51.09 % C, 3.22% H, 14.89% N; Found: 50.96% C, 3.14% H, 14.97% N.

5-Chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**4**). White crystalline compound. Yield: 80%; m.p. 123.2–124.0 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.19 (s, 1H, H3), 8.48 (s, 1H, H6), 7.90 (bs, 1H, NH), 7.30–7.25 (m, 2H, H2', H6'), 6.99–6.62 (m, 2H, H3', H5'), 4.59 (d, 2H, $J = 5.9$ Hz, NCH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 161.9, 159.2, 152.0, 144.0, 142.6, 142.4, 129.6, 129.3, 114.2, 55.3, 43.1; IR (cm^{-1}) 3388 (N-H), 1659 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$ (277.71): 56.22% C, 4.36% H, 15.13% N; Found: 56.26% C, 4.34% H, 15.01% N.

N-Benzyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (**5**). White crystalline compound. Yield: 87%; m.p. 58.3–59.7 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 9.48 (t, 1H, $J = 6.3$ Hz, NH), 9.19 (s, 1H, H3), 8.81 (s, 1H, H5), 7.34–7.20 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 4.50 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 163.1, 148.1, 143.8, 143.6, 143.1, 139.4, 128.4, 127.5, 127.0, 42.5; IR (cm^{-1}) 3371 (N-H), 1670 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ (247.68): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N; Found: 58.33% C, 4.12% H, 17.08% N.

6-Chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**6**). White crystalline compound. Yield: 63%; m.p. 68.1–69.8 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.33 (s, 1H, H3), 8.77 (s, 1H, H5), 8.03 (bs, 1H, NH), 7.64–7.42 (m, 4H, H2', H4', H5', H6'), 4.73 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 161.8, 147.6, 147.5, 143.6, 142.1, 138.5, 131.2 (q, $J = 32.4$ Hz), 130.9, 129.3, 124.6 (q, $J = 3.9$ Hz), 124.5 (q,

$J = 4.0$ Hz), 124.0 (q, $J = 272.9$ Hz), 43.1; IR (cm^{-1}) 3324 (N-H), 1672 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$ (315.68): 49.46% C, 2.87% H, 13.31% N; Found: 49.57% C, 2.71% H, 13.56% N.

6-Chloro-N-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (7). White crystalline compound. Yield: 91%; m.p. 93.2–94.5 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.32 (s, 1H, H3), 8.76 (s, 1H, H5), 7.97 (bs, 1H, NH), 7.37–7.31 (m, 2H, H2', H6'), 7.28–7.20 (m, 2H, H3', H5'), 4.63 (d, 2H, $J = 6.1$ Hz, NCH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 161.7, 147.5, 147.4, 143.7, 142.0, 135.9, 133.6, 129.2, 128.9, 42.9; IR (cm^{-1}) 3387 (N-H), 1667 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ (282.13): 51.09% C, 3.22% H, 14.89% N; Found: 51.23% C, 3.37% H, 14.76% N.

6-Chloro-N-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (8). White crystalline compound. Yield: 89%; m.p. 71.4–72.6 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.32 (s, 1H, H3), 8.73 (s, 1H, H5), 7.88 (bs, 1H, NH), 7.31–7.25 (m, 2H, H2', H6'), 6.91–6.85 (m, 2H, H3', H5'), 4.59 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, NCH_2), 3.80 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 161.5, 159.2, 147.5, 147.2, 144.0, 142.0, 129.5, 129.3, 114.2, 55.3, 43.1; IR (cm^{-1}) 3370 (N-H), 1662 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$ (277.71): 56.22% C, 4.36% H, 15.13% N; Found: 56.34% C, 4.38% H, 15.03% N.

N-Benzyl-5-tert-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (9). White crystalline compound. Yield: 61%; m.p. 69.7–71.3 °C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 9.35 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, NH), 9.04 (s, 1H, H3), 7.33–7.20 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 4.48 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz, NCH_2), 1.48 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 162.8, 162.0, 145.5, 142.4, 140.1, 139.3, 128.4, 127.6, 127.0, 42.6, 38.6, 28.2; IR (cm^{-1}) 3399 (N-H), 1669 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}$ (303.79): 63.26% C, 5.97% H, 13.83% N; Found: 63.39% C, 6.13% H, 13.67% N.

5-tert-Butyl-6-chloro-N-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (10). White crystalline compound. Yield: 59%; m.p. 74.4–75.3 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.21 (s, 1H, H3), 7.98 (bs, 1H, NH), 7.60 (s, 1H, H2'), 7.58–7.45 (m, 3H, H4', H5', H6'), 4.72 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz, NCH_2), 1.53 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 164.5, 162.3, 145.9, 140.8, 140.2, 138.8, 131.2, 131.1 (q, $J = 32.3$ Hz), 129.3, 124.5 (q, $J = 3.9$ Hz), 124.4 (q, $J = 3.9$ Hz), 123.9 (q, $J = 272.9$ Hz), 42.9, 38.9, 28.3; IR (cm^{-1}) 3373 (N-H), 1676 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}$ (371.78): 54.92% C, 4.61% H, 11.30% N; Found: 54.86% C, 4.53% H, 11.35% N.

5-tert-Butyl-6-chloro-N-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (11). White crystalline compound. Yield: 82%; m.p. 67.5–68.7 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 9.19 (s, 1H, H3), 7.91 (bs, 1H, NH), 7.39–7.19 (m, 4H, H2', H3', H5', H6'), 4.62 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz, NCH_2), 1.52 (s, 9H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 164.4, 162.1, 140.9, 140.1, 136.2, 133.5, 131.5, 129.2, 128.9, 42.7, 38.9, 28.3; IR (cm^{-1}) 3376 (N-H), 1659 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ (338.23): 56.82% C, 5.07% H, 12.42% N; Found: 56.76% C, 5.18% H, 12.25% N.

5-tert-Butyl-6-chloro-N-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (12). White crystalline compound. Yield: 84%; m.p. 71.3–72.7 °C; $^1\text{H-NMR}$ (CHCl_3) δ 9.19 (s, 1H, H3), 7.84 (bs, 1H, NH), 7.31–7.25 (m, 2H, H2', H6'), 6.91–6.85 (m, 2H, H3', H5'), 4.59 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 3.80 (3H, s), 1.52 (9H, s); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 164.1, 161.9, 159.1, 141.1, 140.2, 140.1, 129.7, 129.3, 114.1, 55.3, 42.9, 38.8, 28.2; IR (cm^{-1}) 3324 (N-H), 1673 (C=O); Anal. Calcd. For $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_2$ (333.81): 61.17% C, 6.04% H, 15.13% N; Found: 61.23% C, 6.17% H, 15.01% N.

3.4. HPLC Lipophilicity Determination (Capacity Factor k / Calculated Log k)

An Agilent Technologies 1200 SL liquid chromatography system equipped with a Diode-Array Detector SL G1315C, chromatographic pre-column ZORBAX XDB-C18 5 μ m, 4 \times 4 mm, Part No. 7995118-504 and column ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA) were used. The separation process was controlled by Agilent ChemStation, version B.04.02 extended by spectral module (Agilent Technologies Inc.). A solution of MeOH (HPLC grade, 70%) with H₂O (HPLC-Milli-Q Grade, 30%) was used as mobile phase. The total flow of the column was 1.0 mL/min, injection 20 μ L, column temperature 30 $^{\circ}$ C. 210 nm as detection wavelength and 270 nm as monitor wavelength were chosen. The KI methanol solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) of synthesized compounds were measured in minutes. The capacity factors k were calculated using Microsoft Excel according to formula $k = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute and T_D denotes the dead time obtained via an unretained analyte. Log k , calculated from the capacity factor k , is used as the lipophilicity index converted to log P scale.

3.5. Lipophilicity Calculations

Log P (the logarithm of the partition coefficient for *n*-octanol/water) and Clog P (the logarithm of *n*-octanol/water partition coefficient P based on established chemical interactions) were calculated using the program CS ChemBioDraw Ultra version 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

3.6. Biological Methods

3.6.1. Evaluation of *In Vitro* Antimycobacterial Activity

Microdilution panel method. Antimycobacterial evaluation was shielded by Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic. Four mycobacterial strains were used: *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). Tested compounds were dissolved in DMSO (to final concentrations 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.563 μ g/mL), diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) and placed into microdilution panel. Tested species were added in the form of suspension in isotonic saline solution. The final concentration of DMSO did not exceed 1% (v/v), this concentration of DMSO did not affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semisynthetic medium at pH 6.0 and 37 $^{\circ}$ C. The antimycobacterial activity was determined visually after 14 days (6 days for *M. kansasii*) of incubation as minimally inhibition concentration (MIC, μ g/mL), *i.e.*, the lowest concentration of tested substance which inhibited the growth of mycobacteria.

3.6.2. Evaluation of *In Vitro* Antifungal Activity

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic, performed the antifungal susceptibility assays, which

was carried out using microdilution broth method [29,30]. Compounds were dissolved in DMSO and diluted in a twofold manner with RPMI 1640 medium with glutamine buffered to pH 7.0 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid). The final concentration of DMSO in the tested medium did not exceed 2.5% (v/v) of the total solution composition. Drug-free controls were included. Fluconazole was used as standard. The MICs were determined after 24 and 48 h, respectively after 72 and 120 h for *Trichophyton mentagrophytes* (TM), of static incubation in dark at 35 °C. Tested species: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigates* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

3.6.3. Study of the Inhibition of Oxygen Evolution rate in Spinach Chloroplasts

Chloroplasts were prepared from spinach (*Spinacia oleracea* L.) according to Masarovičová and Král'ová [31]. The inhibition of photosynthetic electron transport (PET) in spinach chloroplasts was determined spectrophotometrically (Genesys 6, Thermo Scientific, Madison, WI, USA) using an artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP) according to Král'ová *et al.* [33] and the rate of photosynthetic electron transport (PET) was monitored as a photo-reduction of DCPIP. The measurements were carried out in a phosphate buffer (0.02 mol/L, pH 7.2) containing sucrose (0.4 mol/L), MgCl₂ (0.005 mol/L) and NaCl (0.015 mol/L). The chlorophyll content was 30 mg/L in these experiments and the samples were irradiated (~100 W/m²) from a 10 cm distance with halogen lamp (250 W) using a 4 cm water filter to prevent warming of the samples (suspension temperature 22 °C). The studied compounds were dissolved in DMSO due to their limited water solubility. The applied DMSO concentration (up to 4%) did not affect the photochemical activity in spinach chloroplasts (PET). The inhibitory efficiency of the studied compounds was expressed as the IC₅₀ values, *i.e.*, molar concentration of the compounds causing 50% decrease in the oxygen evolution relative to the untreated control. The comparable IC₅₀ value for a selective herbicide 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Diurone®, DCMU) was about 1.9 μmol/L [33].

3.6.4. Study of Fluorescence of Chlorophyll *a* and Aromatic Amino Acids in Spinach Chloroplasts

The fluorescence emission spectra of chlorophyll *a* (Chl*a*) and aromatic amino acids in spinach chloroplasts were recorded on fluorescence spectrophotometer F-2000 (Hitachi, Tokyo, Japan) using excitation wavelength $\lambda_{\text{ex}} = 436$ nm for monitoring fluorescence of Chl*a* and $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm for monitoring fluorescence of aromatic amino acids, excitation slit 20 nm and emission slit 10 nm. The samples were kept in the dark 2 min before measuring. The phosphate buffer used for dilution of the chloroplast suspension was the same as described above. Due to low aqueous solubility the compounds were added to a chloroplast suspension in DMSO solution. The DMSO concentration in all samples was the same as in the control (10%). The chlorophyll concentration in chloroplast suspension was 10 mg/L.

4. Conclusions

A series of twelve binuclear pyrazinamide analogues containing -CONH-CH₂- bridges was synthesized by the condensation of substituted pyrazine-2-carboxylic acid chlorides with the corresponding benzylamines. The final products were characterized by analytical data and evaluated

for their *in vitro* antimycobacterial, antifungal, antibacterial and photosynthesis-inhibiting activity. Lipophilicity of the compounds was determined using RP-HPLC method and calculated using predicting program CS ChemBioDraw Ultra version 12.0. The obtained values were compared with each other and graphically expressed as dependence of calculated Clog *P* on log *k*. Compounds **8**, **10** and **12** had *in vitro* antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* comparable with PZA (MIC = 6.25 µg/mL). More importantly, 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-methoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**12**) was active against tested MOTTs (*M. kansasii* and *M. avium*), which are unsusceptible to PZA. No clear dependence between lipophilicity and antimycobacterial activity has been found in this series. The highest antifungal activity (MIC = 15.6 µmol/L) against susceptible strain (*Trichophyton mentagrophytes*) was observed for 5-chloro-*N*-(3-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**), other compounds showed only weak or none *in vitro* antifungal activity. None of the studied compounds exhibited any significant activity against tested bacterial strains. 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamide (**9**, IC₅₀ = 7.4 µmol/L). The most active compounds in inhibition of PET in spinach chloroplasts (*Spinacia oleracea* L.) were 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamide (**9**, IC₅₀ = 7.4 µmol/L) and 5-*tert*-butyl-6-chloro-*N*-(4-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**11**, IC₅₀ = 13.4 µmol/L). Based on the obtained results it can be assumed, that in this series of pyrazinamide derivatives the antimycobacterial and antifungal activities did not depend directly on compound's lipophilicity. On the other hand, PET-inhibiting activity increased linearly with compound's lipophilicity.

Acknowledgements

This work was financially supported by GAUK B-CH/710312, IGA NT 13346 (2012) and SVV-2012-265-001 as well as by the Slovak Grant Agency VEGA (grant No. 1/0612/11) and by Sanofi-Aventis Pharma Slovakia. The publication is, a result of the project implementation: Support of establishment, development, and mobility of quality research teams at the Charles University, project number CZ.1.07/2.3.00/30.0022, supported by The Education for Competitiveness Operational Programme (ECOP) and co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Authors wish to thank Ida Dufková for performing *in vitro* antifungal and antibacterial screening, Jiří Kuneš for recording of NMR spectra and Jan Zitko for language corrections.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. 2011/2012 Tuberculosis Global Facts. Available online: http://www.who.int/tb/publications/2011/factsheet_tb_2011.pdf (accessed on 14 September 2012).
2. Goletti, D.; Weissman, D.; Jackson, R.W.; Graham, N.M.; Vlahov, D.; Klein, R.S.; Munsiff, S.S.; Ortona, L.; Cauda, R.; Fauci, A.S. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1271–1278.
3. Lima, C.H.S.; Bispo, M.L.F.; de Souza, M.V.N. Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. *Rev. Virtual Quim.* **2011**, *3*, 159–180.

4. Zhang, Y.; Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6–21.
5. Konno, K.; Feldmann, F.M.; McDermott, W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461–469.
6. Scorpio, A.; Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 662–667.
7. Zhang, Y.; Wade, M.M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 790–795.
8. Ngo, S.C.; Zimhony, O.; Chung, W.J.; Sayahi, H.; Jacobs, W.R., Jr.; Welch, J.T. Inhibition of isolated mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2430–2435.
9. Zimhony, O.; Cox, J.S.; Welch, J.T.; Vilcheze, C.; Jacobs, W.R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FAS-I) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043–1047.
10. Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Arai, M.; Welch, J.T.; Jacobs, W.R. Pyrazinoic acid and its *n*-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 752–754.
11. Sayahi, H.; Zimhony, O.; Jacobs, W.R.; Shekhtman, A.; Welch, J.T. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4804–4807.
12. 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. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2167–2172.
13. Shi, W.; Zhang, X.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J.S.; Barry, C.E., 3rd; Wang, H.; Zhang, W.; Zhang, Y. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2011**, *333*, 1630–1632.
14. Doležal, M.; Král'ová, K. Synthesis and Evaluation of Pyrazine Derivatives with Herbicidal Activity. In *Herbicides, Theory and Applications*; Soloneski, S., Larramendy, M.L., Eds.; InTech: Vienna, Austria, 2011; pp. 581–610.
15. Dolezal, M.; Zitko, J.; Osicka, Z.; Kunes, J.; Vejsova, M.; Buchta, V.; Dohnal, J.; Jampilek, J.; Kralova, K. Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules* **2010**, *15*, 8567–8581.
16. Dolezal, M.; Cmedlova, P.; Palek, L.; Vinsova, J.; Kunes, J.; Buchta, V.; Jampilek, J.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1105–1113.
17. Doležal, M.; Tumová, L.; Kešetovičová, D.; Tuma, J.; Král'ová, K. Substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides, their synthesis and evaluation as herbicides and abiotic elicitors. *Molecules* **2007**, *12*, 2589–2598.
18. Doležal, M.; Král'ová, K.; Šeršeň, F.; Miletín, M. The site of action of pyrazine-2-carboxylic acids in the photosynthetic apparatus. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2001**, *26*, 13–20.
19. Dolezal, M.; Kesetovic, D.; Zitko, J. Antimycobacterial evaluation of pyrazinoic acid reversible derivatives. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3506–3514.

20. Matulenko, M.A.; Lee, C.H.; Jiang, M.; Frey, R.R.; Cowart, M.D.; Bayburt, E.K.; DiDomenico, S. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine: Structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3705–3720.
21. Abe, Y.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F.; Okada, S.; Ozasayma, E. Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. JP Patent 44012898, 1969; *Chem. Abstr.* **1969**, *71*, 112979y.
22. Doležal, M.; Hartl, J.; Miletín, M.; Macháček, M.; Král'ová, K. Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* **1999**, *53*, 126–130.
23. Jones, R.N.; Barry, A.L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality-control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 1920–1925.
24. 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**, *19*, 1471–1476.
25. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 131–160.
26. Král'ová, K.; Šeršeň, F.; Kubicová, L.; Waisser, K. Inhibitory effects of substituted benzanilides on Photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts. *Chem. Pap.* **1999**, *53*, 328–331.
27. Kubicová, L.; Král'ová, K.; Šeršeň, F.; Gregor, J.; Waisser, K. Effects of substituted salicylanilides on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2000**, *25*, 89–96.
28. Clayden, J. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2008; pp. 276–296.
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Method for Antifungal Disc Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline M44-A*; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2004.
30. Doležal, M.; Jampílek, J.; Osička, Z.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Víchová, P. Substituted 5-aryloxy-pyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco* **2003**, *58*, 1105–1111.
31. Masarovičová, E.; Král'ová, K. Approaches to measuring plant photosynthesis activity. In *Handbook of Photosynthesis*, 2nd ed.; Pessarakli, M., Ed.; Taylor & Francis group: Boca Raton, FL, USA, 2005; pp. 617–656.
32. Král'ová, K.; Šeršeň, F.; Sidóová, E. Photosynthesis Inhibition produced by 2-alkylthio-6-*R*-benzothiazoles. *Chem. Pap.* **1992**, *46*, 348–350.
33. Fedke, C. *Biochemistry and Physiology of Herbicide Action*; Springer Verlag: Berlin, Germany, 1982.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

PŘÍLOHA P2

SERVUSOVÁ, B., J. VOBICKOVÁ, P. PATEROVÁ, V. KUBÍČEK, J. KUNEŠ, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2013**, 23(12), 3589-3591. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₁ = 2.554.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and antimycobacterial evaluation of N-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides



Barbora Servusová^{a,*}, Jana Vobicková^a, Pavla Paterová^b, Vladimír Kubíček^a, Jiří Kuneš^a, Martin Doležal^a, Jan Zitko^a

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

^b Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2013

Revised 4 April 2013

Accepted 6 April 2013

Available online 21 April 2013

Keywords:

Pyrazinamide derivatives

Benzylamines

Anilines

Antimycobacterial activity

Lipophilicity

ABSTRACT

To develop new potential antimycobacterial drugs, a series of pyrazinamide derivatives was designed, synthesized and tested for their ability to inhibit the growth of selected mycobacterial strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium kansasii* and two strains of *Mycobacterium avium*). This Letter is focused on binuclear pyrazinamide analogues containing the –CONH–CH₂– bridge, namely on *N*-benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamides with various substituents on the phenyl ring and their comparison with some analogously substituted 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. Compounds from the *N*-benzyl series exerted lower antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv than corresponding anilides, however comparable with pyrazinamide (12.5–25 µg/mL). Remarkably, 5-chloro-*N*-(4-methylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**8**, MIC = 3.13 µg/mL) and 5-chloro-*N*-(2-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**1**, MIC = 6.25 µg/mL) were active against *M. kansasii*, which is naturally unsusceptible to PZA. Basic structure–activity relationships are presented.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

Tuberculosis (TB) is considered to be one of the most frequent infectious diseases especially in developing countries. In 2011, there were about 8.7 million new cases of TB and 1.4 million deaths.¹ Multidrug-resistant TB (MDR-TB, characterized as resistance to, at least, isoniazid and rifampicin), extensively drug-resistant TB (XDR-TB), totally drug-resistant TB (TDR-TB) and also co-infection with HIV² remain a serious public health problem primarily in underdeveloped countries and underline the need to develop novel anti-tubercular agents.¹

Pyrazinamide (PZA), a nicotinamide analogue, plays an important role in TB-therapy.³ PZA has multiple mechanisms of action and as a prodrug, it is metabolized via mycobacterial enzyme pyrazinamidase (EC 3.5.1.19) to form pyrazinoic acid (POA).⁴ POA accumulates intracellularly and lowers pH in mycobacterial cell, which leads to inhibition of membrane transport and depletion of energy.⁵ Along with rifampicin, PZA has also a sterilizing activity, which is a crucial factor in shortening the duration of therapy.⁶

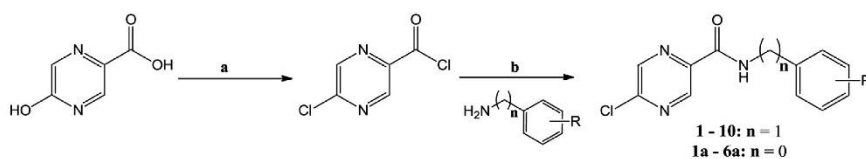
During the last years, the specific targets of PZA and/or POA were recognized. As previous studies suggested,^{7–10} both PZA and POA were confirmed as inhibitors of fatty acid synthase I (FAS I), which participates in the synthesis of cell wall components. The studies of Sayahi et al. showed that PZA¹¹ and 5-Cl-PZA¹² are able to competitively displace the NADPH cofactor from FAS I. Finally, another specific target for POA (but not for PZA), ribosomal protein S1 (RpsA)

involved in protein translation, was identified. POA prevents binding of tmRNA to RpsA and thus blocks trans-translation (the process involving the release of ribosomes stalled during translation).¹³

5-Cl-PZA proved to be active *in vitro* against both PZA susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains (MIC = 16 µg/mL) and PZA resistant mycobacterial strains (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium avium*; MIC = 8–64 µg/mL).¹⁴ Therefore it became a pattern for target compounds mentioned in this paper. The series of substituted *N*-benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamides (**1–10**) and 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**1a–6a**) were synthesized and compared to study the influence of incorporated methylene moiety in the connecting bridge and also to continue to study of the substituent variability influence on the biological activity.

Final structures were prepared by convenient two-step synthesis¹⁵ using 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (5-hydroxy-POA) as a starting material (see Scheme 1). During the first step 5-hydroxy-POA was treated with thionyl chloride to form 5-chloropyrazine-2-carbonyl chloride.¹⁶ Dimethylformamide (DMF) was added to the reaction mixture as a catalyst.¹⁷ Final structures were prepared by aminolysis of the corresponding acyl chloride by various anilines and benzylamines. Reaction proceeded under mild conditions (at RT in acetone), triethylamine (TEA) was used to neutralize the originating HCl. All prepared compounds (white solid or crystalline) were characterized by analytical data (¹H NMR, ¹³C NMR, IR spectroscopy, melting point and elementary analysis). The analytical data were fully

* Corresponding author. Tel.: +420 495067272; fax: +420 495518002.
E-mail address: barbora.servusova@faf.cuni.cz (B. Servusová).



Scheme 1. Synthesis of final compounds **1–10** and **1a–6a**. Reagents: (a) SOCl_2 , DMF, toluene; (b) TEA, acetone.

consistent with proposed structures and are enclosed in the Supplementary data.

Compound's lipophilicity plays important role in drug's passage through the mycobacterial cell wall, which contains a large amount of lipid components¹⁸ and thus our attention was paid to lipophilicity determination. Parameters $\log P/C\log P$ were calculated by commercially available program (ChemDraw Ultra, ver. 12.0),¹⁹ measured using RP-HPLC determination¹⁵ of capacity factor k expressed as $\log k$ and are shown in Table 1. The dependences of the calculated $\log P/C\log P$ values on the measured $\log k$ parameters for *N*-benzyl series showed an approximate linearity and are illustrated in Figure 1. The corresponding correlations can be expressed by the following regression equations:

$$C\log P = 2.936(\pm 0.2359)\log k + 1.740(\pm 0.1022) \quad (1)$$

$$R = 0.9509 \quad s = 0.1150 \quad F = 154.8 \quad n = 10$$

$$\log P = 2.981(\pm 0.3301)\log k + 0.791(\pm 0.1430) \quad (2)$$

$$R = 0.9107 \quad s = 0.1608 \quad F = 81.56 \quad n = 10$$

Similar dependence of lipophilicity parameters was not found for *N*-phenyl series, possibly due to the formation of intramolecular hydrogen bond by *m*- OCH_3 and NH group by compound **3a**.

Prepared compounds were screened for their antimycobacterial activity against four mycobacterial strains by microdilution panel method, described in our previous published papers¹⁵ and referred in Supplementary data. Results were expressed as minimal inhibition concentration (MIC) in $\mu\text{g/mL}$, or with respect to the molecular weight of final products in $\mu\text{mol/L}$ (values in parentheses), for the results see Table 1.

The vast majority of compounds from *N*-benzyl series exhibited antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv comparable with pyrazinamide (MIC = 12.5–25 $\mu\text{g/mL}$). Taking into account the higher molecular weight of the prepared derivatives, compounds **6** (MIC = 38 $\mu\text{mol/L}$) and **9** (MIC = 39 $\mu\text{mol/L}$) showed almost three times better activity than PZA (MIC = 102–203 $\mu\text{mol/L}$). On the other hand, in comparison with analogously substituted anilides (**1a–6a**), whose antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv is mostly in range MIC = 0.78–6.25 $\mu\text{g/mL}$, the activity is lower. We inferred a conclusion that incorporation of methylene moiety leads to the drop in the activity but not to the complete loss.

On the other hand, 5-chloro-*N*-(4-methylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**8**, MIC = 3.13 $\mu\text{g/mL}$) and 5-chloro-*N*-(2-chloro-benzyl)pyrazine-2-carboxamide (**1**, MIC = 6.25 $\mu\text{g/mL}$) showed significant activity against *M. kansasii*, which is naturally unsusceptible to PZA (MIC >100 $\mu\text{g/mL}$). Except for the compound **2a**, none of the prepared compounds exhibited any activity against the tested strains of *M. avium*. No significant differences in antimycobacterial activity between compounds with electron-withdrawing and electron-donating substitution were observed. Also no direct correlation between lipophilicity ($\log k$) and antimycobacterial activity ($\log(1/\text{MIC})$) was found.

The *N*-substituted 5-Cl-PZA derivatives presented in this paper are stable under neutral pH conditions so we do not expect them to be hydrolysed in the testing media. It is also probable that the large substituent on the carboxamide nitrogen will prevent the pyrazinamidase from converting the compounds to 5-chloropyrazine-2-carboxylic acid (5-Cl-POA). This leads us to

Table 1
Physicochemical data of prepared compounds, their antimycobacterial activity expressed as minimal inhibition concentration (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ or $\mu\text{mol/L}$ (data in parentheses), comparison of calculated and determined lipophilicity parameters

No.	Structure	MW	Antimycobacterial activity ($\mu\text{g/mL}$) ($\mu\text{mol/L}$)				Lipophilicity		
			<i>M. tbc</i> H37RV	<i>M. kansasii</i> ^a	<i>M. avium</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c	$\log k$	$\log P$	$C\log P$
1	2-Cl	282.13	25 (89)	6.25	>100	>100	0.41683	2.12	3.09819
1a	2-Cl	268.10	0.78 (3)	n.a. ^d	>100	>100	0.81931	2.05	2.08469
2	3-Cl	282.13	25 (89)	50	>100	>100	0.42294	2.12	3.09819
2a	3-Cl	268.10	3.13 (12)	25	25	25	0.58731	2.05	2.93464
3	2,4- OCH_3	307.73	>100	>100	>100	>100	0.22665	1.31	2.39319
3a	2,4- OCH_3	293.71	>100	>100	>100	>100	0.57911	1.24	1.51424
4	2-F	265.67	25 (94)	50	>100	>100	0.33949	1.72	2.52819
4a	2-F	251.64	6.25 (25)	12.5	>100	>100	0.49028	1.65	1.76469
5	3- NO_2	292.68	>100	12.5	>100	>100	0.11886	1.06	2.12819
5a	3- NO_2	278.65	3.13 (11)	n.a. ^d	>100	>100	0.34426	1.39	2.00071
6	4-Br	326.58	12.5 (38)	50	>100	>100	0.49806	2.39	3.24819
6a	4-Br	312.55	3.13 (10)	6.25	>100	>100	0.66007	2.32	3.08469
7	2- CH_3	261.71	50 (191)	25	>100	>100	0.39471	2.05	2.83419
8	4- CH_3	261.71	25 (96)	3.13	>100	>100	0.41989	2.05	2.88419
9	2,4-Cl	316.57	12.5 (39)	>100	>100	>100	0.72699	2.68	3.81119
10	2- CF_3	315.68	25 (79)	100	>100	>100	0.48509	2.48	3.26819
PZA	---	123.11	12.5–25 (102–203)	>100	>100	>100	n.d.	−1.31	−0.676
INH	---	137.14	1.56 (11)	12.5	25	6.25	n.d.	0.60	0.668
INH	---	137.14	1.56 (11)	12.5	25	6.25	n.d.	−0.60	−0.668

^a CNCTC My 235/80.

^b CNCTC My 80/72.

^c CNCTC My 152/73.

^d Data not available due to poor sensitivity of the tested strain.

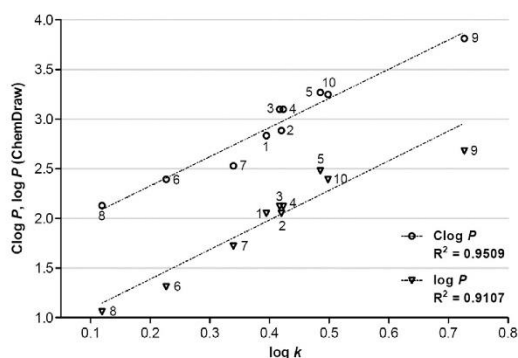


Figure 1. Relationships between calculated $\log P$ / $C\log P$ parameters and experimentally found $\log k$ values of *N*-benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamides.

the idea that the title compounds act rather as they are and not as prodrugs of 5-Cl-PZA or 5-Cl-POA.

All prepared compounds were also screened for their antifungal^{15,20} and antibacterial^{21,22} activities, which were negligible in comparison with used standards. Methods of biological screening are included in the Supplementary data.

Sixteen new compounds were prepared, characterized by analytical data, screened for biological activity and mutually compared in terms of antimycobacterial activity. Based on the results of biological evaluation, the incorporation of methylene moiety seems to be disadvantageous, since anilides of 5-chloropyrazine-2-carboxamide showed better activity.

Acknowledgments

This work was financially supported by GAUK B-CH/710312, IGA NT 13346 (2012) and SVV-2013-267-001. The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235, the title

of the project: TEAB. Authors wish to thank Ida Dufková for performing in vitro antifungal and antibacterial screening.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.021>.

References and notes

- World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. WHO/HTM/TB/2012.6.
- Goletti, D.; Weissman, D.; Jackson, R. W.; Graham, N. M.; Vlahov, D.; Klein, R. S.; Munsiff, S. S.; Ortona, L.; Cauda, R.; Fauci, A. S. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1271.
- Lima, C. H. S.; Bispo, M. L. F.; de Souza, M. V. N. *Rev. Virtual Quim.* **2011**, *3*, 159.
- Konno, K.; Feldmann, F. M.; McDermott, W. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461.
- Zhang, Y.; Wade, M. M.; Scorpio, A.; Zhang, H.; Sun, Z. *J. Antimicrob. Ch.* **2003**, *52*, 790.
- Zhang, Y.; Mitchison, D. *Int. J. Tubercul. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6.
- Zimhony, O.; Cox, J. S.; Welch, J. T. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043.
- Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Barry, C. E. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2167.
- Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Aral, M.; Welch, J. T.; Jacobs, W. R. *Antimicrob. Agents Ch.* **2007**, *51*, 752.
- Ngo, S.; Zimhony, O.; Chung, W. J.; Sayahi, H.; Jacobs, W. R.; Welch, J. T. *Antimicrob. Agents Ch.* **2007**, *51*, 2430.
- Sayahi, H.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R., Jr.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4804.
- Sayahi, H.; Pugliese, K. M.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R., Jr.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2582.
- Shi, W.; Zhang, W.; Jiang, X.; Yuan, H.; Lee, J. S.; Barry, C. E.; Wang, H. H.; Zhang, W. H.; Zhang, Y. *Science* **2011**, *333*, 1630.
- Cynamon, M. H.; Speirs, R. J.; Welch, J. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 462.
- Servusová, B.; Eibinová, D.; Doležal, M.; Kubiček, V.; Paterová, P.; Peško, M.; Králová, K. *Molecules* **2012**, *17*, 13183.
- Matulenko, M. A.; Lee, C. H.; Jiang, M.; Frey, R. R.; Cowart, M. D.; Bayburt, E. K.; DiDomenico, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3705.
- Clayden, J. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 2008.
- Hett, E. C.; Rubin, E. J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 126.
- CS ChemDraw Ultra ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Method for Antifungal Disc Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline M44-A; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2004.
- Jones, R. N.; Barry, A. L. *J. Clin. Microbiol.* **1920**, *1987*, 25.
- Zitko, J.; Doležal, M.; Svobodová, M.; Vejsová, M.; Kuneš, J.; Kučera, R.; Jílek, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1471.

Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 5-chloropyrazine-2-carboxamides

Barbora Servusová^{a,*}, Jana Vobicková^a, Pavla Paterová^b, Vladimír Kubíček^a, Jiří Kuneš^a, Martin Doležal^a and Jan Zitko^a

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

^b Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Experimental

1. General

All organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Germany). The reactions were monitored using Merck Silica 60 F254 TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were purified using an automated chromatograph CombiFlash *R*_f (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040–0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany); gradient elution (hexane/ethyl-acetate), detection wavelength 260 nm, monitor wavelength 280 nm. NMR analysis was performed on Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C or for comp. **5** and **7** on Varian Mercury-Vx BB 500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). IR spectra were recorded in KBr blocks on Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA). Elementary analysis was performed on CE Instruments EA-1110 CHN analyser (CE Instruments, Wigan, UK). Melting points were determined on Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected.

2. Analytical data of prepared compounds

5-chloro-*N*-(2-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**1**). White crystalline comp. Yield: 68 %; m.p. 121.6–122.3 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H, H3), 8.51 (s, 1H, H6), 8.12 (bs, 1H, NH), 7.48–7.36 (m, 2H, H3', H4'), 7.30–7.22 (m, 2H, H5', H6'), 4.75 (d, 2H, *J*=6.3 Hz, NCH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.05, 152.11, 143.97, 142.51, 142.48, 134.93, 133.75, 130.25, 129.63, 129.21, 127.15, 41.52; IR (KBr, cm⁻¹) 3389 (N-H), 1678 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₂H₉Cl₂N₃O: C 51.09, H 3.22, N 14.89; Found: C 51.19, H 3.19, N 14.76.

* Corresponding author. Tel.: + 420 495067272; fax: + 420 495518002; e-mail: barbora.servusova@faf.cuni.cz

5-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**1a**). White crystalline comp. Yield: 47 %; m.p. 149.1-150.0 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.17 (bs, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, H3), 8.62 (s, 1H, H6), 8.59 (dd, 1H, *J*=8.2 Hz, *J*=1.5 Hz, H6'), 7.43 (dd, 1H, *J*=8.2 Hz, *J*=1.5 Hz, H3'), 7.38-7.31 (m, 1H, H5'), 7.15-7.08 (m, 1H, H4'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.9, 152.6, 144.2, 142.6, 134.0, 131.5, 129.3, 127.9, 125.3, 123.5, 121.2; IR (KBr, cm⁻¹) 3332 (N-H), 1695 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₁H₇Cl₂N₃O: C 49.28, H 2.63, N 15.67; Found: C 49.35, H 2.64, N 15.62.

5-chloro-*N*-(3-chlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**). White crystalline comp. Yield: 71 %; m.p. 97.4-98.2 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.20 (s, 1H, H3), 8.51 (s, 1H, H6), 8.02 (bs, 1H, NH), 7.32 (s, 1H, H2'), 7.29 – 7.19 (m, 3H, H4', H5', H6'), 4.64 (d, *J*=6.2 Hz, NCH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.11, 152.23, 144.03, 142.51, 142.35, 139.56, 134.61, 130.04, 127.89, 127.81, 125.89, 42.90; IR (KBr, cm⁻¹) 3359 (N-H), 1677 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₂H₉Cl₂N₃O: C 51.09, H 3.22, N 14.89; Found: C 51.12, H 3.29, N 14.83.

5-chloro-*N*-(3-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**2a**). White crystalline comp. Yield: 98 %; m.p. 124.8-126.6 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.49 (bs 1H, NH), 9.25 (s, 1H, H3), 8.57 (s, 1H, H6), 7.85 (s, 1H, H2'), 7.58 (m, 1H, H6'), 7.31 (t, 1H, *J*=8.1 Hz, H5'), 7.15 (m, 1H, H4'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.9, 152.6, 144.2, 142.4, 142.2, 138.1, 134.9, 130.2, 125.1, 119.9, 117.8; IR (KBr, cm⁻¹) 3358 (N-H), 1686 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₁H₇Cl₂N₃O: C 49.28, H 2.63, N 15.67; Found: C 49.20, H 2.49, N 15.81.

5-chloro-*N*-(2,4-dimethoxybenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**3**). White crystalline comp. Yield: 76 %; m.p. 141.8-143.1 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.16 (s, 1H, H3), 8.48 (s, 1H, H6), 8.04 (bs, 1H, NH), 7.26 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, H6'), 6.46 (s, 1H, H3'), 6.42 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, H5'), 4.58 (d, 2H, *J*=6.0 Hz, NCH₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.79 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.64, 160.70, 158.64, 151.73, 143.93, 142.99, 142.37, 130.57, 118.08, 103.93, 98.66, 55.40, 55.38, 38.97; IR (KBr, cm⁻¹) 3348 (N-H), 1668 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₄H₁₄ClN₃O₃: C 54.64, H 4.59, N 11.52; Found: C 54.48, H 4.71, N 11.70.

5-chloro-*N*-(2,4-dimethoxyphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**3a**). White crystalline comp. Yield: 59 %; m.p. 183.0-184.2 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.87 (bs, 1H, NH), 9.09 (s, 1H, H3), 8.92 (s, 1H, H6), 8.17 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H6'), 6.70 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, H3'), 6.57 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H5'), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.3, 157.1, 151.3, 150.4, 143.6, 143.3, 143.2, 120.9, 119.8, 104.6, 99.1, 56.3, 55.6; IR (KBr, cm⁻¹) 3363 (N-H), 1681 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₃H₁₂ClN₃O₃: C 53.16, H 4.12, N 12.07; Found: C 53.23, H 4.17, N 11.98.

5-chloro-*N*-(2-fluorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**4**). White crystalline comp. Yield: 72 %; m.p. 109.8-111.4 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H, H3), 8.50 (s, 1H, H6), 8.03 (bs, 1H, NH), 7.42-7.37 (m, 1H, H6'), 7.31-7.26 (m, 1H, H4'), 7.14-7.10 (m, 1H, H5'), 7.09-7.04 (m, 1H, H3'), 4.71 (d, 2H, *J*=6.4 Hz, NCH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 162.1, 161.1 (d, *J*=246.5 Hz), 152.1, 144.0, 142.5, 142.4, 130.3 (d, *J*=3.9 Hz), 129.6 (d, *J*=7.8 Hz), 124.5 (d, *J*=22.5 Hz), 124.4 (d, *J*=10.8 Hz), 115.5 (d, *J*=10.8 Hz), 37.6 (d, *J*=3.9 Hz); IR

(KBr, cm^{-1}) 3386 (N-H), 1677 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClFN}_3\text{O}$: C 54.25, H 3.41, N 15.82; Found: C 54.18, H 3.40, N 15.99.

5-chloro-*N*-(2-fluorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**4a**). White crystalline comp. Yield: 66 %; m.p. 145.3-146.1 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.79 (bs, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, H3), 8.60 (s, 1H, H6), 8.51 (m, 1H, H6'), 7.24-7.09 (m, 3H, H3', H4', H5'); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 159.9, 152.8 (d, $J=244.5$ Hz), 152.6, 144.2, 142.6, 142.4, 125.7 (d, $J=10.8$ Hz), 125.1 (d, $J=1.1$ Hz), 124.8 (d, $J=3.9$ Hz), 121.4, 115.1 (d, $J=19.6$ Hz); IR (KBr, cm^{-1}) 3353 (N-H), 1698 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClFN}_3\text{O}$: C 52.50, H 2.80, N 14.09; Found: C 52.54, H 2.84, N 14.01.

5-chloro-*N*-(3-nitrobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**5**). White crystalline comp. Yield: 75 %; m.p. 154.5-155.5 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.19 (s, 1H, H3), 8.52 (s, 1H, H6), 8.19 (s, 1H, H2'), 8.14 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H4'), 8.07 (bs, 1H, NH), 7.73 – 7.68 (m, 1H, H5'), 7.54 (d, 1H, $J=7.9$ Hz, H6'), 4.77 (d, 2H, $J=6.3$ Hz, NCH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 162.40, 152.43, 148.44, 144.05, 142.61, 142.11, 139.81, 133.83, 129.77, 122.71, 122.43, 42.68; IR (KBr, cm^{-1}) 3405 (N-H), 1674 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_3$: C 49.24, H 3.10, N 19.14; Found: C 49.13, H 3.07, N 18.98.

5-chloro-*N*-(3-nitrophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**5a**). White crystalline comp. Yield: 51 %; m.p. 224.5-225.6 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.25 (bs, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, H3), 8.94 (s, 1H, H6), 8.91 (s, 1H, H2'), 8.30-8.24 (m, 1H, H6'), 8.00-7.94 (m, 1H, H4'), 7.65 (t, 1H, $J=8.2$ Hz, H5'); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.8, 151.5, 148.1, 144.4, 143.5, 143.2, 139.5, 130.3, 126.9, 119.0, 115.1; IR (KBr, cm^{-1}) 3323 (N-H), 1683 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClN}_4\text{O}_3$: C 47.21, H 2.53, N 20.11; Found: C 47.34, H 2.57, N 20.18.

5-chloro-*N*-(4-bromobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**6**). White crystalline comp. Yield: 89 %; m.p. 122.4-122.9 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.19 (s, 1H, H3), 8.49 (s, 1H, H6), 8.00 (bs, 1H, NH), 7.46 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H2', H6'), 7.21 (d, 2H, $J=8.4$ Hz, H3', H5'), 4.61 (d, 2H, $J=6.1$ Hz, NCH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 162.07, 152.19, 143.99, 142.49, 142.36, 136.56, 131.85, 129.49, 121.63, 42.87; IR (KBr, cm^{-1}) 3393 (N-H), 1666 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrClN}_3\text{O}$: C 44.13, H 4.90, N 12.87; Found: C 44.05, H 4.97, N 12.75.

5-chloro-*N*-(4-bromophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**6a**). White crystalline comp. Yield: 86 %; m.p. 195.9-197.6 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.48 (bs, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, H3), 8.58 (s, 1H, H6), 7.68-7.61 (m, 2H, H2', H6'), 7.54-7.48 (m, 2H, H3', H5'); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 152.6, 144.2, 142.4, 142.3, 136.1, 132.2, 121.4, 117.7; IR (KBr, cm^{-1}) 3360 (N-H), 1683 (C=O); Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{BrClN}_3\text{O}$: C 42.27, H 2.26, N 13.44; Found: C 42.15, H 2.17, N 13.56.

5-chloro-*N*-(2-methylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**7**). White crystalline comp. Yield: 58 %; m.p. 105.6-106.9 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.20 (s, 1H, H3), 8.48 (s, 1H, H6), 7.82 (bs, 1H, NH), 7.33 – 7.16 (m, 4H, H3', H4', H5', H6'), 4.66 (d, 2H, $J=5.7$ Hz, NCH_2), 2.37 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 161.80, 152.06, 143.98, 142.53, 142.44, 136.46, 135.10, 130.62, 128.61, 128.01, 126.30, 41.73, 19.05; IR (KBr, cm^{-1}) 3375 (N-H),

1678 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₃H₁₂ClN₃O: C 59.66, H 4.62, N 16.06; Found: C 59.83, H 4.69, N 15.91.

5-chloro-*N*-(4-methylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**8**). White crystalline comp. Yield: 69 %; m.p. 120.9-121.7 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.20 (s, 1H, H3), 8.47 (s, 1H, H6), 7.94 (bs, 1H, NH), 7.24 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H2', H6'), 7.16 (d, 2H, *J*=8.2 Hz, H3', H5'), 4.62 (d, 2H, *J*=6.0 Hz, NCH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.90, 152.00, 143.98, 142.63, 142.42, 137.48, 134.43, 129.44, 127.86, 43.33, 21.07; IR (KBr, cm⁻¹) 3395 (N-H), 1679 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₃H₁₂ClN₃O: C 59.66, H 4.62, N 16.06; Found: C 59.71, H 4.80, N 15.95.

5-chloro-*N*-(2,4-dichlorobenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**9**). White crystalline comp. Yield: 72 %; m.p. 111.9-113.7 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.16 (s, 1H, H3), 8.51 (s, 1H, H6), 8.11 (bs, 1H, NH), 7.40 (s, 1H, H3'), 7.24 (d, 1H, *J*=2.1 Hz, H5'), 7.21 (d, 1H, *J*=2.1 Hz, H6'), 4.71 (d, 2H, *J*=6.3 Hz, NCH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.16, 152.26, 143.97, 142.56, 142.30, 134.36, 134.34, 133.61, 131.07, 129.46, 127.41, 40.96; IR (KBr, cm⁻¹) 3409 (N-H), 1676 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₂H₈Cl₃N₃O: C 45.53, H 5.05, N 13.27; Found: C 45.39, H 5.01, N 13.16.

5-chloro-*N*-(2-trifluoromethylbenzyl)pyrazine-2-carboxamide (**10**). White crystalline comp. Yield: 80 %; m.p. 113.9-114.7 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H, H3), 8.50 (s, 1H, H6), 8.04 (bs, 1H, NH), 7.68 (d, 1H, *J*=7.7 Hz, H3'), 7.61 (d, 1H, H5'), 7.53 (t, 1H, *J*=7.7 Hz, H6'), 7.41 (t, 1H, *J*=7.7 Hz, H4'), 4.84 (d, 2H, *J*=6.4 Hz, NCH₂); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 162.1, 152.2, 144.1, 142.6, 142.4, 135.9 (q, *J*=1.1 Hz), 132.4 (q, *J*=1.0 Hz), 130.8, 128.3 (q, *J*=30.3 Hz), 127.9, 126.1 (q, *J*=5.4 Hz), 124.4 (q, *J*=273.9 Hz), 40.2 (q, *J*=2.5 Hz); IR (KBr, cm⁻¹) 3289 (N-H), 1668 (C=O); Anal. Calcd. for C₁₃H₉ClF₃N₃O: C 49.46, H 2.87, N 13.31; Found: C 49.54, H 3.01, N 13.44.

3. HPLC lipophilicity determination

- capacity factor *k* and calculated log *k*

Agilent Technologies 1200 SL liquid chromatography with Diode-array Detector SL G1315C, chromatographic pre-column ZORBAX XDB-C18 5 μm, 4 x 4 mm, Part No. 7995118-504 and column ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μm, 4.6 x 250 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA) were used. The separation process was controlled by Agilent ChemStation, version B.04.02 extended by spectral module (Agilent Technologies Inc.). A solution of MeOH (HPLC grade, 70 %) with H₂O (HPLC-Milli-Q Grade, 30 %) was used as mobile phase. The total flow of the column was 1.0 mL/min, injection 20 μL, column temperature 30 °C. 210 nm as detection wavelength and 270 nm as monitor wavelength were chosen. The KI methanol solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) of synthesized compounds were measured in minutes. The capacity factors *k* were calculated using Microsoft Excel according to formula $k = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute and T_D denotes the dead time

obtained via an unretained analyte. Log k , calculated from the capacity factor k , is used as the lipophilicity index converted to log P scale.

4. Biological methods

4.1. *In vitro* antimycobacterial evaluation

Microdilution panel method. Antimycobacterial evaluation was shielded by Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic. Four mycobacterial strains were used: *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). Tested compounds were dissolved in DMSO (to final concentrations 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 and 1.563 $\mu\text{g/mL}$), diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) and placed into microdilution panel. Tested species were added in the form of suspension in isotonic saline solution. The final concentration of DMSO did not exceed 1 % (v/v), this concentration of DMSO did not affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semisynthetic medium at pH 6.0 and 37 °C. The antimycobacterial activity was determined visually after 14 days (6 days for *M. kansasii*) of incubation as minimally inhibition concentration (MIC, $\mu\text{g/mL}$), *i.e.* the lowest concentration of tested substance which inhibited the growth of mycobacteria.

4.2. *In vitro* antibacterial evaluation

Microdilution broth method. The organisms examined included strains from Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. These strains are recommended as standards for testing of antibacterial activities. Other strains were clinical isolates (Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* H 5996/08-methicilin resistant (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL positive. All strains were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C and maintained on the same medium at 4 °C. Prior to testing, each strain was passaged onto MHA. Bacterial inocula were prepared by suspending in sterile 0.85% saline. The cell density of the inoculum was adjusted to yield suspension of density equivalent 0.5 McFarland scale (1.5 – 10⁸ viable CFU/mL). The compounds were dissolved in DMSO, and the antibacterial activity was determined in Mueller-Hinton liquid broth (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. Controls consisted of medium and DMSO alone. The final concentration of DMSO in the test medium did not exceed 1% (v/v) of the total solution composition. The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as 95% inhibition of bacterial growth as compared to control, was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C.

4.3. *In vitro* antifungal evaluation

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic, performed the antifungal susceptibility assays, which was carried out using microdilution broth method. Compounds were dissolved in DMSO and diluted in a twofold manner with RPMI 1640 medium with glutamine buffered to pH 7.0 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid). The final concentration of DMSO in the tested medium did not exceed 2.5 % (v/v) of the total solution composition. Drug-free controls were included. Fluconazole was used as standard. The MICs were determined after 24 and 48 h, respectively after 72 and 120 h for *Trichophyton mentagrophytes*, of static incubation in dark at 35 °C. Tested species: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigates* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445.

PŘÍLOHA P3

ZITKO, J., B. SERVUSOVÁ-VANÁSKOVÁ, P. PATEROVÁ, L. NAVRÁTILOVÁ, F. TREJTNAR, J. KUNEŠ, M. DOLEŽAL. Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Papers*, **2016**, 70(5), 649-657. [ISSN (Print) 0366-6352]. IF₂₀₁₄ = 1.468.

ORIGINAL PAPER

Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new
N-phenylpyrazine-2-carboxamides

^aJan Zitko*, ^aBarbora Servusová-Vaňásková*, ^{a,b}Pavla Paterová,
^aLucie Navrátilová, ^aFrantišek Trejtnar, ^aJiří Kuneš, ^aMartin Doležal

^aFaculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50005, Czech Republic

^bDepartment of Clinical Microbiology, University Hospital, Hradec Králové 50005, Czech Republic

Received 26 August 2015; Revised 30 September 2015; Accepted 21 October 2015

N-Phenylpyrazine-2-carboxamides (anilides of pyrazinoic acids with simple substituents in various positions) were previously shown to possess significant biological activities in vitro, markedly anti-mycobacterial and photosynthesis-inhibiting activity. Based on structure-activity relationships (SAR) extracted from previously published series, 25 new anilides of non-substituted pyrazinoic acid (POA), 5-CH₃-POA, 6-Cl-POA, 5-*tert*-butyl-POA and 5-*tert*-butyl-6-Cl-POA were designed and synthesised. The phenyl part was substituted with simple hydrophobic substituents chosen from methyl and halogens. 5-*tert*-Butyl-*N*-(5-fluoro-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**9**), *N*-(3-chloro-4-methylphenyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**12**), 6-chloro-*N*-(3-chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**13**) and 6-chloro-*N*-(5-iodo-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**18**) possessed whole cell anti-mycobacterial activity in vitro against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv with minimum inhibitory concentration (MIC) of around 10 μM. Importantly, no cytotoxicity in the HepG2 model was detected in vitro at the concentrations tested and the estimated IC₅₀ values were in hundreds of μM, indicating promising selectivity. *N*-(3-Chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**11**) and *N*-(4-chloro-2-iodophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**21**) exerted significant activity against *Mycobacterium kansasii* with MIC 12.6 μM and 8.7 μM, respectively. No activity was detected against *Mycobacterium avium*. SARs were in accordance with those observed for the derivatives previously published.

© 2015 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

Keywords: anilide, anti-mycobacterial activity, cytotoxicity in vitro, lipophilicity, pyrazinoic acid

Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most lethal and frequent infectious diseases worldwide. According to the World Health Organisation (2014), there were 9 million new cases of TB and 1.5 million deaths associated with TB (including 0.36 million deaths of HIV-positives) in 2013. The alarming increase in drug-resistant TB strains, namely multi-drug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR), as well as the increasing number of patients co-infected with HIV (1.1 million, which represents

approximately 13 % of new TB cases in 2013) constitutes a serious problem and emphasises the need for novel anti-tubercular agents. Accordingly, the search for new anti-tuberculosis drugs is an important research topic (Nemeček et al., 2013; Krátký et al., 2015).

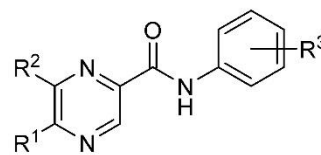
Pyrazinamide (PZA), a first-line anti-tubercular agent, is a model compound used as a starting point for the design of *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides presented in this paper. Although PZA has been used in clinical practice since the 1950s, its complex mechanism of action is not yet fully understood. The non-

*Corresponding author, e-mail: jan.zitko@faf.cuni.cz, barbora.servusova@faf.cuni.cz

specific mechanism based on the accumulation of the pyrazinoic acid (POA; active metabolite) in the mycobacterial cell and the acidification of the cytoplasm is generally recognised. However, recent studies have shown that POA also has a specific intracellular target. Most importantly, Shi et al. (2011) showed that POA prevents the binding of tmRNA to the ribosomal protein S1 (RpsA), leading to the inhibition of trans-translation, the vital process of rescuing stalled ribosomes. Recently, Yang et al. (2015) determined the structure of POA-RpsA co-crystallised complex and, on the basis of the interactions observed, proposed possible favourable modifications of POA in respect of anti-mycobacterial activity. This clearly demonstrates that PZA, POA and their derivatives are still in focus.

For several years, *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides (i.e. anilides of POA) have been the focus of the working group led by Doležal at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (Hradec Králové, Czech Republic). More than one hundred anilides were synthesised and evaluated as potential anti-infective agents with anti-mycobacterial, antibacterial or antifungal activity (Doležal et al., 2002, 2006, 2008, 2009, 2010). Many *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides also proved to be effective photosynthesis inhibitors in the spinach chloroplast model, interrupting the photosynthetic electron transport (PET) in photosystem II (PS II) (Doležal et al., 2002, 2006, 2008, 2010). For further information and SAR on the PET-inhibiting activity, (Doležal & Kralova, 2011). Several other research groups have focused on potential anti-tuberculosis agents containing the carboxanilide pattern. Gonc et al. (2015) prepared and tested derivatives of naphthalene-2-carboxanilides (Kos et al., 2015a), and quinoline-2-carboxanilides (Kos et al., 2015b) as potential anti-tuberculosis agents. The working group led by Vinsova focused on anti-tuberculosis salicylanilides (Kratky & Vinsova, 2011). Recently, these researchers developed salicylanilides esterified with POA (compounds combining two active anti-tuberculosis fragments – the salicylanilide and POA). These compounds exhibited promising micromolar to sub-micromolar activity in vitro against multidrug-resistant mycobacterial strains (Kratky et al., 2014).

The most comprehensive review (Doležal et al., 2012) published on the anti-mycobacterial activity of the *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides in question contains the activity data on 103 derivatives of general formula depicted in Fig. 1. The anilides reported were derived from non-substituted POA, 6-Cl-POA, 5-*tert*-butyl-POA and 5-*tert*-butyl-6-Cl-POA. The phenyl ring was mono-, di- or tri-substituted with small substituents R^3 (Fig. 1) chosen from short alkyl (methyl, isopropyl), methoxy, halogen, CF_3 and hydroxy substituents. The anti-mycobacterial activity was measured in a high-throughput screening campaign run by the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Co-



R^1 ; H, *tert*-butyl

R^2 ; H, Cl

R^3 ; H, OH, OCH_3 , CH_3 , isopropyl, CF_3 , X

Fig. 1. General formula of *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides; X – halogen.

ordinating Facility (TAACF), established by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NI-AID; Bethesda, MD, USA). In the primary screening against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), the activity was expressed as a percentage of growth inhibition at $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ in the BACTEC 12B medium using the microplate alamar blue assay (MABA) (Collins & Franzblau, 1997).

These comprehensive data were used to extract the basic structure-activity relationships (SAR) in respect of the calculated lipophilicity of the compounds and their substitution in the anilide part of the molecule (R^3 ; Fig. 1). Analysis showed that the most anti-mycobacterial activity-enhancing substituents R^3 were 3- CF_3 , 4- CH_3 , 4- $CH(CH_3)_2$, 3-F, and 3,5- CF_3 (Doležal et al., 2012), that is, the electron-withdrawing substituent in the *meta* position and the electron-donating substituent in the *para* position. In the current study, the two counter-acting substituents were combined in one molecule and the $R^3 = 3\text{-Cl-4-}CH_3$ pattern was proposed as the substitution of choice. This was also inspired by the fact that a previous publication showed *N*-(3-iodo-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide to be one of the most active anilides examined, inhibiting the growth of *M. tuberculosis* H37Rv by 95 % at $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Doležal et al., 2011). Other substituent patterns R^3 of the compounds in this article (Fig. 2) originated on the basis of the mutual exchange of various halogen atoms (chlorine for other halogens) and/or positional isomerism, to further confirm that the 3,4-disubstitution is superior to other combinations.

From previous experience with different series of pyrazine derivatives evaluated as potential anti-tuberculosis agents, it is known that activity usually grows with increasing lipophilicity to a certain point but a further increase in lipophilicity often leads to diminished or lost activity of such derivatives. For example, this pertained for various series of PZA derivatives with alkylamino substituents with increasing lengths of carbon chain, where the activity culminated in hexyl- or heptyl-amino derivatives (Servusova et al.,

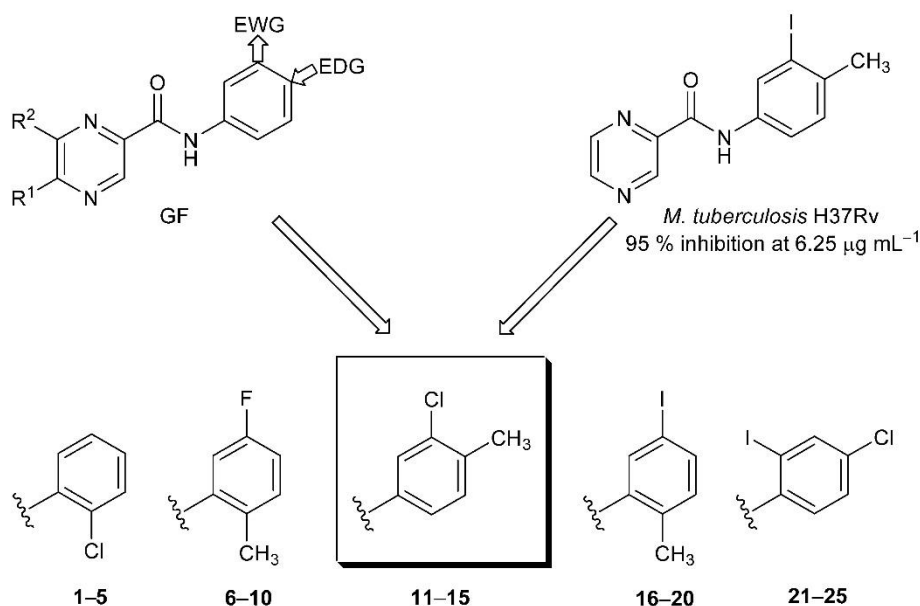


Fig. 2. Design of title compounds (1–25) based on previously determined SAR.

2014; Servusova-Vanaskova et al., 2015a, 2015b; Zitko et al., 2015). Increased lipophilicity of a compound is beneficial for permeation of the highly lipophilic mycobacterial envelope (Brennan, 2003). On the other hand, excessive lipophilicity is associated with insufficient water solubility and the ability of a compound to reach therapeutic concentrations is impaired. These two counteracting phenomena give rise to the optimal range of lipophilicity. The MycPermCheck model developed by Merget et al. (2013) is based on compounds with whole cell anti-mycobacterial activity in vitro found in the literature. The model establishes the optimal lipophilicity range for good permeation as $Q\text{PlogPo}/w = 2.779\text{--}4.479$ where $Q\text{PlogPo}/w$ is the octanol/water partition coefficient predicted by the QikProp module (Schrödinger, USA) (Merget et al., 2013). The anilides designed in this study exhibited increased lipophilicity due to their R^3 substituent, hence they were used to probe the upper lipophilicity limit for the anti-mycobacterial activity in vitro.

In summary, 25 new anilides, which had not previously been described, were designed, synthesised and tested in vitro for anti-mycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv and non-tuberculous mycobacterial strains of *M. kansasii* and *M. avium*.

Experimental

All the organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (Germany). The reactions were monitored using Merck Silica 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Germany). Compounds were

purified using an automated chromatograph CombiFlash R_f (Teledyne Isco, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040–0.063 mm (Merck); gradient elution (hexane/ethyl acetate), detection wavelength of 260 nm, monitor wavelength of 280 nm. NMR analysis was performed on a Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, USA) at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C or on a Varian Mercury-Vx BB 500 (Varian) at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . The chemical shifts were recorded in δ and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). The IR spectra were measured in ATR mode using a Ge crystal-plate on a Nicolet Impact 400 (Nicolet, USA). Elementary analysis was performed on a CE Instruments EA-1110 CHN analyser (CE Instruments, UK). Melting points were determined on a Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, UK) and are uncorrected. $\text{Log}P$ (the logarithm of the partition coefficient for *n*-octanol/water) values were calculated using the CS ChemBioDraw Ultra program ver. 14.0 (CambridgeSoft, USA).

6-Chloropyrazine-2-carboxylic (Abe et al., 1969) (6-Cl-POA), 5-*tert*-butylpyrazine-2-carboxylic (Dolezal et al., 1999) (5-*tert*-Bu-POA) and 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (Dolezal et al., 1999) (5-*tert*-Bu-6-Cl-POA) were synthesised following the known synthetic procedures described elsewhere (Dolezal et al., 1999; Servusova et al., 2014; Venturrello & D'Aloisio, 1986). The analytical data of the prepared starting acids were fully in accordance with the data in the literature and ^1H NMR as well as the melting points are available in the Supplementary Data. POA and 5-methylpyrazine-2-

carboxylic acid (5-CH₃-POA) were purchased from Sigma–Aldrich and used as received.

Synthesis of *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides (1–25)

The corresponding pyrazinoic acid (5.0 mmol) was dispersed in dry toluene (20 mL) and mixed with 1.5 eq. of thionyl chloride (0.55 mL, 7.5 mmol). The reaction mixture was heated to reflux for approximately 1 h. Next, the excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with dry toluene under vacuum. The crude acyl chloride was dissolved in dry acetone (20 mL) and added drop-wise to a stirred solution of the corresponding aniline (5.0 mmol) with triethylamine (5.0 mmol) in dry acetone (30 mL). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for up to 6 h. The completion of the reaction was monitored by TLC (eluent: hexane/ethyl acetate; $\varphi_r = 2 : 1$). The crude product adsorbed on silica gel by solvent evaporation was purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate gradient elution).

The analytical data of the prepared compounds were fully consistent with the proposed structures and are available in the Supplementary Data.

Anti-mycobacterial evaluation *in vitro*

Microdilution panel method (Servusova et al., 2012). The anti-mycobacterial evaluation was carried out by the Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University (Hradec Králové, Czech Republic). Four mycobacterial strains were used: *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). The tested compounds were dissolved and serially diluted in dimethylsulphoxide (DMSO), mixed with Šula's semi-synthetic medium (Trios, Czech Republic) and placed in a microdilution panel. The tested species were added in the form of a suspension in an isotonic saline solution. The final concentrations of tested compounds were of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 3.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1.563 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The final concentration of DMSO did not exceed 1 vol. %; this concentration of DMSO did not affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semi-synthetic medium at pH 6.0 and 37°C. The anti-mycobacterial activity was determined visually after 14 days (6 days for *M. kansasii* and *M. avium*) of incubation as the minimum inhibition concentration (MIC, in $\mu\text{g mL}^{-1}$), *i.e.* the lowest concentration of the tested substance that inhibited the growth of mycobacteria.

Cytotoxicity measurement

The human hepatocellular liver carcinoma cell line HepG2 (passage 40–41) purchased from Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, UK) was routinely cultured in a minimum essentials eagle medium (MEM; Sigma–Aldrich) supplemented with 10 vol. % foetal bovine serum (PAA, Austria), 1 % L-glutamine solution (Sigma–Aldrich) and 1 vol. % non-essential amino acid solution (Sigma–Aldrich) in a humidified atmosphere containing 5 % of CO₂ at 37°C. For sub-culturing, the cells were harvested after trypsin/EDTA (Sigma–Aldrich) treatment at 37°C. The cells treated with the tested substances were used as the experimental groups and untreated HepG2 cells were used as the control groups. The cells were seeded in a density of 1×10^4 cells per well in a 96-well plate. The next day they were treated with the tested substances dissolved in DMSO (maximal incubation concentration of DMSO was 1 vol. %). The tested compounds were prepared at incubation concentrations of 1–7500 μM . The treatment was carried out in triplicates in a humidified atmosphere containing 5 % of CO₂ at 37°C for 24 h. The controls representing 100 % cell viability, 0 % cell viability (cells treated with 10 vol. % DMSO), no-cell controls and vehiculum controls were incubated in triplicate simultaneously. After 24 h exposure, the reagent from the kit CellTiter 96[®] Aqueous one solution cell proliferation assay (Promega, USA) was added according to the manufacturer's recommendation. After 2 h incubation at 37°C in a humidified, 5 % of CO₂ atmosphere, the absorbance was recorded at 490 nm. A standard toxicological parameter IC₅₀ was calculated by non-linear regression analysis of the inhibitory curves using GraphPad Prism software version 6 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results and discussion

Chemistry

Fig. 3 shows that the target derivatives (1–25) were prepared by a convenient two-step synthesis using corresponding starting pyrazinoic acid, which was treated with thionyl chloride to form carbonyl chloride. Various ring-substituted anilines were then used for the aminolysis of carbonyl chloride to form final compounds (1–25) (purified by flash column chromatography); see Table 1. The analytical data of all the prepared compounds were in accordance with the proposed structures and are available in the Supplementary Data. The yields of chromatographically pure products ranged from 17.8 % to 86.6 %. The IR spectrum of all the compounds had a carbonyl (C=O) transmittance peak in the range of 1670–1698 cm^{-1} . The ¹H NMR spectra exhibited amidic hydrogen (-CONH-) as a broad singlet (independently

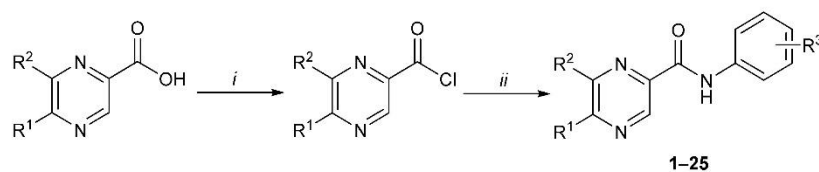


Fig. 3. Synthesis of final compounds (**1–25**); reagents and conditions: (i) SOCl_2 , toluene, reflux, 1 h; (ii) substituted aniline, TEA, acetone, AT, up to 6 h.

Table 1. Summary of prepared compounds. Anti-mycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv and *M. kansasii* in vitro expressed as MIC

No.	Molecular mass	Substituent			MIC/($\mu\text{g mL}^{-1}$)		logP
		R ¹	R ²	R ³	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. kansasii</i>	
1	233.66	H	H	2-Cl	50	50	1.15
2	247.68	CH ₃	H	2-Cl	25	> 50	1.85
3	268.10	H	Cl	2-Cl	100	> 100	2.05
4	289.76	C(CH ₃) ₃	H	2-Cl	> 100	> 100	3.28
5	324.21	C(CH ₃) ₃	Cl	2-Cl	> 100	> 100	4.18
6	231.23	H	H	2-CH ₃ -5-F	25	25	1.23
7	245.26	CH ₃	H	2-CH ₃ -5-F	n.a.	n.a.	1.94
8	265.67	H	Cl	2-CH ₃ -5-F	> 100	> 100	2.13
9	287.34	C(CH ₃) ₃	H	2-CH ₃ -5-F	3.13	> 100	3.36
10	321.87	C(CH ₃) ₃	Cl	2-CH ₃ -5-F	> 100	> 100	4.26
11	247.68	H	H	3-Cl-4-CH ₃	12.5	3.13	1.63
12	261.71	CH ₃	H	3-Cl-4-CH ₃	3.13	12.5	2.34
13	282.12	H	Cl	3-Cl-4-CH ₃	3.13	100	2.53
14	303.79	C(CH ₃) ₃	H	3-Cl-4-CH ₃	> 100	> 100	3.76
15	338.23	C(CH ₃) ₃	Cl	3-Cl-4-CH ₃	> 100	> 100	4.66
16	339.14	H	H	2-CH ₃ -5-I	> 100	> 100	2.43
17	353.16	CH ₃	H	2-CH ₃ -5-I	> 100	> 100	3.14
18	373.58	H	Cl	2-CH ₃ -5-I	3.13	> 100	3.33
19	395.24	C(CH ₃) ₃	H	2-CH ₃ -5-I	> 100	> 100	4.56
20	429.69	C(CH ₃) ₃	Cl	2-CH ₃ -5-I	> 100	> 100	5.46
21	359.55	H	H	2-I-4-Cl	6.25	3.13	2.50
22	373.58	CH ₃	H	2-I-4-Cl	> 50 ^a	> 50 ^a	3.21
23	393.99	H	Cl	2-I-4-Cl	> 100	25	3.41
24	415.66	C(CH ₃) ₃	H	2-I-4-Cl	> 50 ^a	> 50 ^a	4.63
25	450.10	C(CH ₃) ₃	Cl	2-I-4-Cl	> 50 ^a	> 50 ^a	5.53
INH	137.14	–	–	–	0.2–0.78	1.56–6.25	–0.64
PZA	123.12	–	–	–	12.5	> 100	–1.31

a) Measurement at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ not performed due to precipitation of tested compound in testing medium; INH – isoniazid, PZA – pyrazinamide, n.a. – data not available.

of the solvent) in the range of δ 10.96–9.31. The ^{13}C NMR spectra of all the compounds exhibited carbonyl carbon ($-\text{CONH}-$) in the range of δ 168.2–159.3.

Anti-mycobacterial activity

Final compounds (**1–25**) were assayed in vitro for whole cell anti-mycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii*, and *M. avium* using a two-fold dilution microplate method. The results (Table 1) are expressed as MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

To determine the substituents in the pyrazine (R¹, R²) and anilide (R³) parts of the molecule with a pos-

itive effect on anti-mycobacterial activity within the newly prepared series of compounds (**1–25**), the individual compounds were scored with points according to the following rule: high activity, MIC = 3.13–6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 3 points; moderate activity, MIC = 12.5–25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2 points; weak activity, MIC = 50–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1 point; no activity, MIC > 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MIC > 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for compounds (**22**), (**24**) and (**25**)), 0 points. Table 2 presents the scores of the individual substituents for both *M. tuberculosis* and *M. kansasii* activity; the number in parentheses is the total number of active compounds (high, moderate or weak activity) with the respective substitution. Fig. 4 graphically summarises the level of activity against

Table 2. Activity score of various substitution patterns and their hydrophobic substituent constants π

	Anilide part (R^3)					Pyrazine part (R^1, R^2)				
	2-Cl	2-CH ₃ -5-F	3-Cl-4-CH ₃	2-CH ₃ -5-I	2-I-4-Cl	H	5-CH ₃	6-Cl	5- <i>tert</i> -Bu	5- <i>tert</i> -Bu-6-Cl
π	0.56	0.64	1.04	1.84	1.91	0	0.7	0.9	2.13	3.03
<i>M. tuberculosis</i>	4 (3)	5 (2)	8 (3)	3 (1)	3 (1)	8 (4)	5 (2)	7 (3)	3 (1)	0 (0)
<i>M. kansasii</i>	1 (1)	2 (1)	6 (3)	0 (0)	5 (2)	9 (4)	2 (1)	3 (2)	0 (0)	0 (0)

π – Hydrophobic substituent constant; calculated as $\log P(RX) - \log P(RH)$, where RX is substituted derivative and RH is non-substituted derivative. See text for rules used for calculation of the score; numbers in parentheses represent the total number of active compounds with the respective substitution.

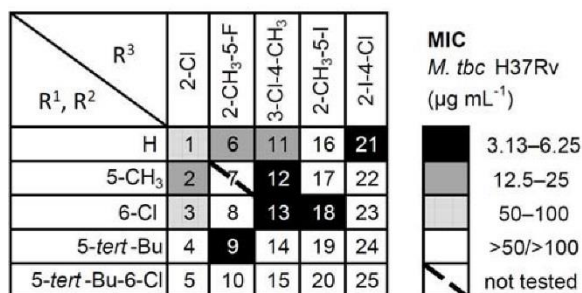


Fig. 4. Level of antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv according to combinations of substituents in pyrazine and phenyl part.

M. tuberculosis H37Rv according to combinations of substituents R^1, R^2 and R^3 .

On reviewing the activity against *M. tuberculosis* H37Rv as depicted in Table 2 and Fig. 4, it is obvious that the most beneficial substitution on the phenyl is $R^3 = 3\text{-Cl-4-CH}_3$, which produced two compounds with high activity (12, 13) and one with moderate activity (11), scoring 8 points. This substitution pattern is fully compliant with the general formula GF (Fig. 2), bearing the electron-withdrawing *meta* halogen and electron-donating methyl in the *para* position. Interestingly, this substitution pattern also performed best against *M. kansasii*. The activity of compounds with $R^3 = 2\text{-CH}_3\text{-5-F}$ (6–10) and, in particular, $R^3 = 2\text{-CH}_3\text{-5-I}$ (16–20) is probably reduced by the *ortho* methyl group, the negative effect of which on antimycobacterial activity was identified in the previously published review (Dolezal et al., 2012). In the present case, the negative effect of *ortho* methyl often counteracts the positive effect of *meta* withdrawing halogens. Similarly, *ortho*-halogen substitution was also disadvantageous, e.g. $R^3 = 2\text{-Cl}$ in compounds (1–5) and $R^3 = 2\text{-I-4-CH}_3$ in (22–25). Moreover, these compounds lack the *meta*-withdrawing substituent, apparently important for the anti-mycobacterial activity. From the activities published in the review (Dolezal et al., 2012), it appears that the phenyl part does not tolerate *ortho* substituents (e.g. 2,6-Cl₂, 2-CH₃; 2-X-5-OH, where X is halogen). This may be due to steric hindrance with the structure of the potential target,

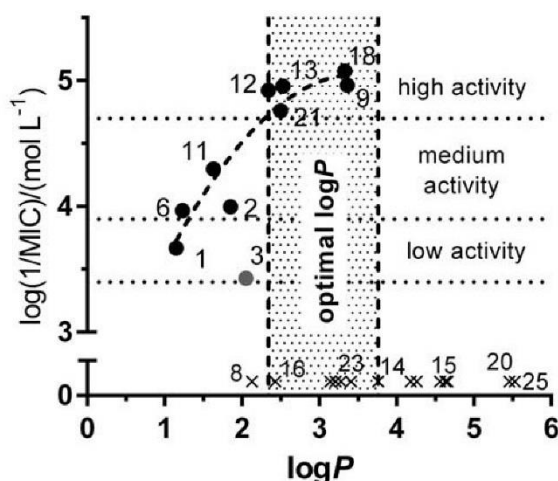


Fig. 5. Plot of anti-mycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv vs. calculated lipophilicity for compounds (1–25); ○ – active, × – not active.

although this cannot currently be confirmed.

Considering the pyrazine part of the molecule, the best scores were achieved by non-substituted pyrazine, followed by 6-Cl and 5-CH₃ (it should be noted that 5-CH₃ substitution might have been hampered due to missing activity data for compound (7)). The anilides derived from 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid were completely inactive. This observation is in contrast with the SAR extracted from the review (Dolezal et al., 2012), where the series derived from 5-*tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid possessed significant activities. However, these compounds often bore the hydrophilic substituent ($R^3 = 2\text{-OH}, 3\text{-OH},$ or 4-OH) counteracting the lipophilic substitution of the pyrazine part, or the substituent with a small increase in lipophilicity such as $R^3 = 3\text{-F}$ ($\pi_{\text{Ph}} = + 0.16$). The combination of highly lipophilic phenyl substitution patterns used in this study with a highly lipophilic substitution of the pyrazine ring ($R^1 = \textit{tert}$ -Bu, $R^2 = \text{Cl}$) is, therefore, disadvantageous.

Fig. 5 presents the plot of activity ($\log(1/\text{MIC})$ in μM) against *M. tuberculosis* H37Rv vs. calculated

Table 3. Cytotoxicity of tested substances in HepG2 cells

No.	IC ₅₀ /μM	MIC of <i>M. tuberculosis</i> /μM	SI = IC ₅₀ /MIC
9	> 50 ^a (573.3) ^b	10.9	> 4.59 (52.6) ^c
11	> 250 ^a	50.5	> 4.95
12	> 100 ^a (343.5) ^b	12.0	> 8.36 (28.7) ^c
13	> 250 ^a (820.7) ^b	11.1	> 22.54 (74.0) ^c
18	> 50 ^a (653.8) ^b	8.4	> 5.97 (78.0) ^c
21	> 100 ^a	17.4	> 5.75

a) Measurement at higher concentration not reproducible (precipitation of compound in cell culture medium); b) number in parentheses represents hypothetical IC₅₀ value calculated from the trend of inhibitory curve; c) number in parentheses represents SI calculated based on hypothetical IC₅₀ value.

lipophilicity $\log P$. Among the active compounds, their activity increased with lipophilicity. The compounds with high activity (MIC = 3.13–6.25 μg mL⁻¹) possessed $\log P$ in the range from 2.34 to 3.36. This can be regarded as the optimal lipophilicity in the series under discussion. The compounds with $\log P \geq 3.76$ were inactive. This limit value can be deduced from compounds (**11**–**15**) with the successful substitution pattern R³ = 3-Cl-4-CH₃, where compounds (**11**–**13**) are active and compounds (**14**) ($\log P = 3.76$) and (**15**) ($\log P = 4.76$) are completely inactive. However, it is obvious that lipophilicity is only a secondary determinant of anti-mycobacterial activity, probably facilitating the penetration through the lipophilic mycobacterial cell wall. Compounds (**4**), (**16**), (**17**), and (**22**) lie within the optimal lipophilicity range but still are inactive. This can be explained by the negative influence of substituent R³, for example, substituent (2-CH₃, 2-Cl, or 2-I) in the *ortho* position as discussed above or non-compliance with the *meta*-EWG rule. This negative steric effect is obvious for 2-Cl and 2-I substitution; the effect of 2-CH₃ is unclear, as compound (**18**) (R¹ = H, R² = Cl, R³ = 2-CH₃-5-I) is highly active, but other compounds with the same phenyl substitution (**16**), (**17**), (**19**) and (**20**) are inactive.

The most active compounds achieved MIC against *M. tuberculosis* H37Rv (or *M. kansasii*) at the level of 3.13 μg mL⁻¹ or 6.25 μg mL⁻¹, which are values comparable with the values of previously reported anilides (of comparable MW) with MIC = 2–8 μg mL⁻¹ (Dolezal et al., 2009) or MIC = 3.13–6.25 μg mL⁻¹ (Dolezal et al., 2011b). In recently published data on anilides of 5-Cl-POA (Zitko et al., 2013), the phenyl part tolerated a wider range of substituents than the anilides of non-substituted POA, 5-CH₃-POA, 6-Cl-POA, 5-*tert*-Bu-POA and 5-*tert*-Bu-6-Cl-POA currently described or in the review published previously. In the light of anti-mycobacterial activity, 5-Cl-POA derivatives appear to be special structures, as demonstrated by the ability of 5-chloropyrazine-2-carboxamide to inhibit the mycobacterial fatty acid synthase I (Ngo et al., 2007; Sayahi et al., 2012).

None of compounds (**1**–**25**) exhibited any activity against any of the two tested strains of *M. avium*.

Cytotoxicity

Drug-induced hepatotoxicity is an unfortunate common side-effect of many of the first line anti-tuberculosis agents (PZA, isoniazid, rifampicin) (Tostmann et al., 2008a). In view of the multidrug mixture approach used for the treatment of tuberculosis, it is highly probable that a newly developed anti-tuberculosis compound would be used in combination with clinically established agents. Due to possible toxicity synergism, the potential hepatotoxicity of new compounds developed as potential anti-tuberculosis agents should be assessed carefully. The human liver carcinoma cell line (HepG2) is used as a model for hepatotoxicity studies in vitro (Singh et al., 2011; Tostmann et al., 2008b).

A hepatotoxicity assay of human HepG2 hepatoma cells was performed in vitro for selected compounds: see Table 3. The decrease in viability of the HepG2 cells was measured using a colorimetric assay (Kratky et al., 2012; Owen, 1993) based on the reduction of tetrazolium dye and the results were expressed as IC₅₀. The limited solubility in the culture medium of all the compounds tested did not permit direct determination of the exact IC₅₀ value, but no toxic effect on HepG2 cells was observed up to the highest concentration achieved during the measurement. The IC₅₀ values of compounds (**9**), (**12**–**13**), and (**18**) (Table 3, values in parentheses) were calculated according to the trend of the inhibitory curves by GraphPad Prism software (version 6, non-linear regression analysis). The inhibitory curves for compounds (**11**) and (**21**) did not make it possible to calculate the exact IC₅₀ value. Nevertheless, the IC₅₀ values of all the compounds studied were hundreds of μM, which represents a significantly lower cytotoxicity than the previously published anilides of 5-chloropyrazine-2-carboxylic acid (IC₅₀ mostly in units or tens of μM) (Zitko et al., 2013).

The estimated selectivity index (SI) defined as IC₅₀/MIC both in molar concentrations was calculated for activity against *M. tuberculosis* H37Rv. SI values over 10 are regarded as safe for a drug candidate, granting sufficient difference between efficient and cytotoxic concentrations.

Conclusions

Twenty five new, previously undescribed anilides of substituted pyrazinoic acids were synthesised by known methods. The anti-mycobacterial activity of the final compounds against *M. tuberculosis* H37Rv and non-tuberculous mycobacterial strains of *M. kansasii* and *M. avium* was evaluated in vitro. The compounds so prepared supplement the large family of anilides prepared by Doležal and co-workers. It was shown that similar structure-activity relationships pertain concerning the phenyl substitution pattern. Three new anilides (**12**, **13**, **18**) of substituted pyrazine-2-carboxylic acid exhibited whole cell anti-mycobacterial activity in vitro against *M. tb* H37Rv with MIC around 10 μM . Importantly, no cytotoxicity in the HepG2 model was detected in vitro for the tested concentrations and the estimated IC₅₀ values were in hundreds of μM , indicating promising selectivity. Compounds (**11**) and (**21**) exhibited significant activity against *M. kansasii* with MIC = 3.13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (12.6 μM and 8.7 μM , respectively). No activity was detected against *M. avium*.

Acknowledgements. This study was co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic, project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235, denoted as TEAB. This study was also supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA NZ 13346) and SVV 260 183.

Supplementary Data

The supplementary data associated with this article can be found in the online version of this paper.

References

- Abe, Y., Shigeta, Y., Uchimaru, F., Okada, S., & Ozasayama, E. (1969). JP Patent No. 44,012,898. Tokyo, Japan: Japan Patent Office.
- Brennan, P. J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, *83*, 91–97. DOI: 10.1016/s1472-9792(02)00089-6.
- Collins, L., & Franzblau, S. G. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *41*, 1004–1009.
- Doležal, M., Hartl, J., Miletin, M., Macháček, M., & Králová, K. (1999). Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chemical Papers*, *53*, 126–130.
- Doležal, M., Miletin, M., Kunes, J., & Kralova, K. (2002). Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: Synthesis and biological activity. *Molecules*, *7*, 363–373. DOI: 10.3390/70300363.
- Doležal, M., Palek, L., Vinsova, J., Buchta, V., Jampilek, J., & Kralova, K. (2006). Substituted pyrazinecarboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, *11*, 242–256. DOI: 10.3390/11040242.
- Doležal, M., Cmedlova, P., Palek, L., Vinsova, J., Kunes, J., Buchta, V., Jampilek, J., & Kralova, K. (2008). Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *43*, 1105–1113. DOI: 10.1016/j.ejmech.2007.07.013.
- Doležal, M., Zitko, J., Kešetovičová, D., Kuneš, J., & Svobodová, M. (2009). Substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Molecules*, *14*, 4180–4189. DOI: 10.3390/molecules14104180.
- Doležal, M., Zitko, J., Osicka, Z., Kunes, J., Vejsova, M., Buchta, V., Dohnal, J., Jampilek, J., & Kralova, K. (2010). Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, *15*, 8567–8581. DOI: 10.3390/molecules15128567.
- Doležal, M., & Kralova, K. (2011). Synthesis and evaluation of pyrazine derivatives with herbicidal activity. In P. M. Larramendy (Ed.), *Herbicides, theory and applications* (pp. 581–610). Rijeka, Croatia: InTech.
- Doležal, M., Kesetovic, D., & Zitko, J. (2011). Antimycobacterial evaluation of pyrazinoic acid reversible derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, *17*, 3506–3514. DOI: 10.2174/138161211798194477.
- Doležal, M., Zitko, J., & Jampilek, J. (2012). Pyrazinecarboxylic acid derivatives with antimycobacterial activity. In P. J. Cardona (Ed.), *Understanding tuberculosis – New approaches to fighting against drug resistance*. Rijeka, Croatia: InTech.
- Gonec, T., Zadrazilova, I., Nevin, E., Kauerova, T., Pesko, M., Kos, J., Oravec, M., Kollar, P., Coffey, A., O'Mahony, J., Cizek, A., Kralova, K., & Jampilek, J. (2015). Synthesis and biological evaluation of *N*-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules*, *20*, 9767–9787. DOI: 10.3390/molecules20069767.
- Kos, J., Nevin, E., Soral, M., Kushkevych, I., Gonec, T., Bobal, P., Kollar, P., Coffey, A., O'Mahony, J., Liptaj, T., Kralova, K., & Jampilek, J. (2015a). Synthesis and antimycobacterial properties of ring-substituted 6-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*, 2035–2043. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.03.018.
- Kos, J., Zadrazilova, I., Nevin, E., Soral, M., Gonec, T., Kollar, P., Oravec, M., Coffey, A., O'Mahony, J., Liptaj, T., Kralova, K., & Jampilek, J. (2015b). Ring-substituted 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*, 4188–4196. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.06.047.
- Kratky, M., & Vinsova, J. (2011). Salicylanilide ester prodrugs as potential antimicrobial agents – a Review. *Current Pharmaceutical Design*, *17*, 3494–3505. DOI: 10.2174/138161211798194521.
- Krátký, M., Vinšová, J., Volková, M., Buchta, V., Trejtnar, F., & Stolaříková, J. (2012). Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *50*, 433–440. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.01.060.
- Krátký, M., Vinšová, J., Novotná, E., & Stolaříková, J. (2014). Salicylanilide pyrazinoates inhibit in vitro multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *53*, 1–9. DOI: 10.1016/j.ejps.2013.12.001.
- Krátký, M., Mandíková, J., Trejtnar, F., Buchta, V., Stolaříková, J., & Vinšová, J. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of sulphamethoxazole-based ureas and imidazolidine-2,4,5-triones. *Chemical Papers*, *69*, 1108–1117. DOI: 10.1515/chempap-2015-0109.
- Merget, B., Zilian, D., Muller, T., & Sotriffer, C. A. (2013). MycPermCheck: the *Mycobacterium tuberculosis* permeability prediction tool for small molecules. *Bioinformatics*, *29*, 62–68. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts641.

- Nemeček, P., Mocák, J., Lehotay, J., & Waisser, K. (2013). Prediction of anti-tuberculosis activity of 3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione derivatives. *Chemical Papers*, *67*, 305–312. DOI: 10.2478/s11696-012-0278-4.
- Ngo, S. C., Zimhony, O., Chung, W. J., Sayahi, H., Jacobs, W. R., Jr., & Welch, J. T. (2007). Inhibition of isolated *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*, 2430–2435. DOI: 10.1128/aac.01458-06.
- Owen, T. C. (1993). U.S. Patent No. 5,185,450. Washington, D.C., USA: U.S. Patent and Trademark Office.
- Sayahi, H., Pugliese, K. M., Zimhony, O., Jacobs, W. R., Jr., Shekhtman, A., & Welch, J. T. (2012). Analogs of the antituberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to *M. tuberculosis* fatty acid synthase I. *Chemistry & Biodiversity*, *9*, 2582–2596. DOI: 10.1002/cbdv.201200291.
- Servusová, B., Eibinová, D., Doležal, M., Kubiček, V., Paterová, P., Peško, M., & Králová, K. (2012). Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*, *17*, 13183–13198. DOI: 10.3390/molecules171113183.
- Servusová, B., Paterová, P., Mandíková, J., Kubiček, V., Kučera, R., Kuneš, J., Doležal, M., & Zitko, J. (2014). Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *24*, 450–453. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.054.
- Servusova-Vanaskova, B., Jandourek, O., Paterova, P., Kordulakova, J., Plevakova, M., Kubicck, V., Kuccra, R., Garaj, V., Naesens, L., Kunes, J., Dolezal, M., & Zitko, J. (2015a). Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *MedChemComm*, *6*, 1311–1317. DOI: 10.1039/c5md00178a.
- Servusova-Vanaskova, B., Paterova, P., Garaj, V., Mandikova, J., Kunes, J., Naesens, L., Jilek, P., Dolezal, M., & Zitko, J. (2015b). Synthesis and antimicrobial evaluation of 6-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Biology & Drug Design*, *4*, 674–681. DOI: 10.1111/cbdd.12536.
- Shi, W. L., Zhang, X. L., Jiang, X., Yuan, H. M., Lee, J. S., Barry, C. E., Wang, H. H., Zhang, W. H., & Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, *333*, 1630–1632. DOI: 10.1126/science.1208813.
- Singh, M., Sasi, P., Rai, G., Gupta, V. H., Amarapurkar, D., & Wangikar, P. P. (2011). Studies on toxicity of antitubercular drugs namely isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in an in vitro model of HepG2 cell line. *Medicinal Chemistry Research*, *20*, 1611–1615. DOI: 10.1007/s00044-010-9405-3.
- Tostmann, A., Boeree, M. J., Aarnoutse, R. E., De Lange, W. C. M., Van Der Ven, A., & Dekhuijzen, R. (2008a). Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: Concise up-to-date review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *23*, 192–202. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05207.x.
- Tostmann, A., Boeree, M. J., Peters, W. H. M., Roelofs, H. M. J., Aarnoutse, R. E., van der Ven, A., & Dekhuijzen, P. N. R. (2008b). Isoniazid and its toxic metabolite hydrazine induce in vitro pyrazinamide toxicity. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *31*, 577–580. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.022.
- Venturello, C., & D'Aloisio, R. (1986). European Patent No. 0,201,934. Munich, Germany: European Patent Office.
- World Health Organisation (2014). *WHO. Global tuberculosis report 2014*. Geneva, Switzerland: WHO Press. (WHO/IITM/TB/2014.08)
- Yang, J. J., Liu, Y. D., Bi, J., Cai, Q. X., Liao, X. L., Li, W. Q., Guo, C. Y., Zhang, Q., Lin, T. W., Zhao, Y. F., Wang, H. H., Liu, J., Zhang, X. L., & Lin, D. H. (2015). Structural basis for targeting the ribosomal protein S1 of *Mycobacterium tuberculosis* by pyrazinamide. *Molecular Microbiology*, *95*, 791–803. DOI: 10.1111/mmi.12892.
- Zitko, J., Servusová, B., Paterová, P., Mandíková, J., Kubiček, V., Kučera, R., Hrabcová, V., Kuneš, J., Soukup, O., & Doležal, M. (2013). Synthesis, antimycobacterial activity and in vitro cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*, *18*, 14807–14825. DOI: 10.3390/molecules181214807.
- Zitko, J., Servusová, B., Janoutová, A., Paterová, P., Mandíková, J., Garaj, V., Vejsová, M., Marek, J., & Doležal, M. (2015). Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*, 174–183. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.11.014.

SUPPLEMENTARY DATA

Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides

^aJan Zitko*, ^aBarbora Servusová-Vaňásková*, ^{a,b}Pavla Paterová, ^aLucie Navrátilová,
^aFrantišek Trejtnar, ^aJiří Kuneš, ^aMartin Doležal

^aFaculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50005,
Czech Republic

^bDepartment of Clinical Microbiology, University Hospital, Hradec Králové 50005,
Czech Republic

Received 26 August 2015; Revised 30 September 2015; Accepted 21 October 2015

Analytical data

6-Chloropyrazine-2-carboxylic acid (**III**, (Abe et al., 1969)). White solid, m.p. 155.7-156.9°C ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.79 (s, 1H, CONH), 9.32 (s, 1H, H3), 8.79 (s, 1H, H5). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.09, 148.59, 144.01, 143.92, 133.64.

5-*Tert*-butylpyrazine-2-carboxylic acid (**IV**), (Dolezal et al., 1999)). White solid, m.p. 120.8-122.1°C ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.36 (s, 1H, H3), 8.79 (s, 1H, H6), 8.35 (bs, 1H, COOH), 1.42 (s, 9H, (CH₃)₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.45, 164.58, 144.62, 139.84, 138.49, 37.36, 29.63.

5-*Tert*-butyl-6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (**V**, (Venturello et al., 1986)). White solid, m.p. 161.9-163.7°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.37 (bs, 1H, COOH), 9.18 (s, 1H, H3), 1.56 (s, 9H, C(CH₃)₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.30, 165.21, 147.08, 141.93, 138.18, 39.26, 28.15.

N-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**1**). White solid. Yield 40.3%; m.p. 130.9-132.6°C; IR (cm⁻¹): 3331 (NH), 1690 (CONH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.42 (s, 1H, CONH), 9.33 (s, 1H, H3), 8.98 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H5), 8.84 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6),

*Corresponding author, e-mail: jan.zitko@faf.cuni.cz, barbora.servusova@faf.cuni.cz

8.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H3'), 7.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1Hm H6'), 7.43 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, H4'), 7.24 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5'); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.19, 148.59, 144.01, 143.92, 143.64, 134.20, 129.69, 128.16, 126.46, 125.11 123.40. Anal. Calcd. For $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{O}$ (233.65): 56.54% C, 3.45% H, 17.98% N; Found: 56.61% C, 3.39% H, 17.96% N. $\text{Clog}P = 1.359$; $\text{Log}P = 1.15$.

N-(2-chlorophenyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**2**). White solid. Yield 72.7%; m.p. 149.8-151.7°C; IR (cm^{-1}): 3321 (NH), 1687 (CONH); ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.35 (s, 1H, CONH), 9.18 (s, 1H, H3), 8.71 (s, 1H, H6), 8.24 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H3'), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6'), 7.42 (td, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H, H4'), 7.23 (td, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H, H5'), 2.63 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.33, 158.18, 143.22, 142.97, 141.25, 134.27, 129.65, 128.14, 126.27, 124.86, 123.16, 21.71. Anal. Calcd. For $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$ (247.68): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N; Found: 58.20% C, 4.01% H, 17.03 % N. $\text{Clog}P = 1.858$; $\text{Log}P = 1.85$.

6-Chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**3**). White solid. Yield 78.0%; m.p. 96.5-97.3 °C. IR (cm^{-1}) 3322 (NH), 1670 (CONH), ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.12 (s, 1H, CONH), 9.39 (s, 1H, H3), 8.84 (s, 1H, H5), 8.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H3'), 7.50 – 7.47 (m, 1H, H6'), 7.41 – 7.35 (m, 1H, H4'), 7.16 – 7.12 (m, 1H, H5'). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 159.51, 147.79, 147.65, 143.88, 142.14, 133.85, 129.34, 127.86, 125.51, 123.77, 121.38. Anal. Calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}$ (268.10): 49.28% C; 2.63% H; 15.67% N. Found: 49.30% C; 2.67% H; 15.61% N. $\text{Clog}P = 2.085$; $\text{Log}P = 2.05$.

5-*Tert*-butyl-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**4**). White solid. Yield 48.3%; m.p. 99.8-100.5°C; IR (cm^{-1}): 3335 (NH), 1685 (CONH); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.35 (bs, 1H, CONH), 9.39 (s, 1H, H3), 8.69 (s, 1H, H6), 8.63 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H, H3'), 7.42 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H6'), 7.37 – 7.30 (m, 1H, H4'), 7.09 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, H5'), 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 167.95, 161.23, 142.96, 141.34, 139.34, 134.40, 129.19, 127.79, 124.86, 123.36, 121.11, 37.10, 29.70. Anal. Calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}$ (289.76): 62.18% C, 5.57% H, 14.50% N; Found: 62.30% C, 5.53% H, 14.48% N. $\text{Clog}P = 3.185$; $\text{Log}P = 3.28$.

5-*Tert*-butyl-6-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**5**). White solid. Yield 46.3%; m.p. 107.8-108.9°C; IR (cm^{-1}): 3339 (NH), 1679 (CONH); ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.08 (bs, 1H, CONH), 9.26 (s, 1H, H3), 8.58 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H3'), 7.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H6'), 7.39 – 7.29 (m, 1H, H4'), 7.16 – 7.07 (m, 1H, H5'), 1.56 (s, 9H,

$C(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 164.83, 159.94, 140.95, 140.13, 134.04, 131.46, 129.27, 127.79, 125.21, 123.63, 121.24, 39.02, 28.25. Anal. Calcd. For $C_{15}H_{15}Cl_2N_3O$ (324.21): 55.57% C, 4.66% H, 12.96% N; Found: 55.62% C, 4.59% H, 12.97% N. $ClogP = 3.911$; $LogP = 4.18$.

N-(5-fluoro-2-methyl)pyrazine-2-carboxamide (**6**). White solid. Yield 64.9%; m.p. 107.1-108.3 °C; IR (cm^{-1}): 3349 (NH), 1695 (CONH); 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.26 (s, 1H, CONH), 9.30 (s, 1H, H3), 8.95 (s, 1H, H5), 8.82 (s, 1H, H6), 7.72 – 7.44 (m, 1H, H4'), 7.44 – 7.24 (m, 1H, H6'), 7.05 – 6.81 (m, 1H, H3'), 2.27 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.50, 161.35, 159.44, 148.28, 144.46, 144.04, 143.58, 136.95, 136.86, 131.71, 131.64, 112.15, 111.98, 110.67, 110.47, 16.97. Anal. Calcd. For $C_{12}H_{10}FN_3O$ (231.23): 62.33% C, 4.36% H, 18.17% N; Found: 62.27% C, 4.48% H, 17.99% N. $ClogP = 1.488$; $LogP = 1.23$.

N-(5-fluoro-2-methyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**7**). White solid. Yield 57.0 %; m.p. 142.2-143.0 °C; IR (cm^{-1}): 3351 (NH), 1677 (CONH); 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.96 (s, 1H, CONH), 9.11 (s, 1H, H3), 8.59 (s, 1H, H6), 8.18 (m, 1H, H4') 7.65 (m, 1H, H6'), 7.50 (m, 1H, H3'), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.38 (s, 3H, Ar- CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.01, 161.61, 158.82, 157.83, 143.12, 143.00, 141.74, 137.07, 136.92, 131.70, 131.58, 126.68, 126.64, 112.01, 111.73, 110.50, 110.17, 21.67, 16.96. Anal. Calcd. For $C_{12}H_9ClFN_3O$ (265.67): 54.25% C, 3.41% H, 15.82% N; Found: 54.19% C, 3.51% H, 15.94% N. $ClogP = 2.214$; $LogP = 2.13$.

6-Chloro-*N*-(5-fluoro-2-methyl)pyrazine-2-carboxamide (**8**). White solid. Yield 75.3%; m.p. 145.3-147.5 °C; IR (cm^{-1}): 3374 (NH), 1693 (CONH); 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.23 (s, 1H, CONH), 9.23 (s, 1H, H3), 9.09 (s, 1H, H5), 7.49 (m, 1H, H4'), 7.31 (m, 1H, H6'), 7.01 (m, 1H, H3'), 2.24 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.26, 160.59, 159.34, 147.96, 147.09, 144.56, 142.32, 136.78, 136.70, 131.74, 131.66, 112.69, 112.52, 111.67, 111.48, 17.05. Anal. Calcd. For $C_{12}H_9ClFN_3O$ (265.67): 54.25% C, 3.41% H, 15.82% N; Found: 54.19% C, 3.51% H, 15.94% N. $ClogP = 2.214$; $LogP = 2.13$.

5-*Tert*-butyl-*N*-(5-fluoro-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**9**). White solid. Yield 76.6%; m.p. 148.9-150.5°C; IR (cm^{-1}): 3348 (NH), 1698 (CONH); 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.16 (s, 1H, CONH), 9.21 (s, 1H, H3), 8.90 (s, 1H, H6), 7.81 – 7.56 (m, 1H, H4'), 7.42 – 7.21 (m, 1H, H6'), 7.18 – 6.77 (m, 1H, H3'), 2.27 (s, 3H, CH_3), 1.40 (s, 9H, $C(CH_3)_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 167.43, 161.54, 159.50, 142.38, 141.80, 140.30,

137.07, 136.98, 131.71, 131.64, 126.45, 126.42, 111.90, 111.73, 110.20, 110.00, 37.05, 29.57, 16.90. Anal. Calcd. For $C_{16}H_{18}FN_3O$ (287.33): 66.88% C, 6.31% H, 14.62% N; Found: 55.76% C, 6.34% H, 14.50% N. $ClogP = 3.314$; $LogP = 3.36$.

5-*Tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-fluoro-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**10**). White solid. Yield 43.5%; m.p. 127.4-127.7°C; IR (cm^{-1}): 3367 (NH), 1698 (CONH); 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.17 (s, 1H, CONH), 9.21 (s, 1H, H3), 7.73 – 7.51 (m, 1H, H4'), 7.40 – 7.29 (m, 1H, H6'), 7.19 – 6.75 (m, 1H, H3'), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.57 (s, 9H, C(CH₃)₃); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 163.43, 161.29, 160.56, 159.38, 145.40, 142.09, 140.36, 136.86, 136.78, 131.73, 131.66, 127.62, 112.48, 112.31, 111.26, 111.07, 38.69, 28.16, 16.98. Anal. Calcd. For $C_{16}H_{17}ClFN_3O$ (321.78): 59.72% C, 5.33% H, 13.06% N; Found: 59.79% C, 5.26% H, 13.01% N. $ClogP = 4.040$; $LogP = 4.26$.

N-(3-chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**11**). White solid. Yield 60.5%; m.p. 133.1-134.7°C; IR (cm^{-1}): 3338 (NH), 1684 (CONH); 1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.61 (bs, 1H, CONH), 9.50 (s, 1H, H3), 8.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H5), 8.58 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H6), 7.85 (s, 1H, H2'), 7.58 – 7.46 (m, 1H, H5'), 7.31 – 7.14 (m, 1H, H6'), 2.36 (s, 1H, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160.55, 147.61, 144.64, 144.12, 142.35, 131.16, 120.31, 117.99, 19.52. Anal. Calcd. For $C_{12}H_{10}ClN_3O$ (247.68): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N; Found: 58.23% C, 4.10% H, 16.99% N. $ClogP = 2.708$; $LogP = 1.63$.

N-(3-chloro-4-methylphenyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**12**). White solid. Yield 49.7%; m.p. 143.9-145.6°C; IR (cm^{-1}): 3345 (NH), 1676 (CONH); 1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.57 (bs, 1H, CONH), 9.35 (s, 1H, H3), 8.42 (s, 1H, H6), 7.84 (s, 1H, H2'), 7.55 – 7.48 (m, 1H, H5'), 7.29 – 7.13 (m, 1H, H6'), 2.69 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, Ar-CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160.92, 157.57, 143.57, 142.13, 141.46, 136.13, 134.62, 132.23, 131.13, 120.25, 117.93, 21.89, 19.51. Anal. Calcd. For $C_{13}H_{12}ClN_3O$ (261.71): 59.66% C, 4.62% H, 16.06% N; Found: 59.71% C, 4.59% H, 16.01% N. $ClogP = 3.207$; $LogP = 2.34$.

6-Chloro-*N*-(3-chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**13**). White solid. Yield 28.4%; m.p. 128.7-129.9°C; IR (cm^{-1}): 3340 (NH), 1679 (CONH); 1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.38 (s, 1H, H3), 9.35 (bs, 1H, CONH), 8.81 (s, 1H, H5), 7.85 (s, 1H, H2'), 7.56 – 7.44 (m, 1H, H5'), 7.28 – 7.21 (m, 1H, H6'), 2.37 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.29, 147.66, 147.43, 143.71, 142.20, 135.58, 134.71, 132.85, 131.19, 120.49, 118.17, 19.57. Anal. Calcd. For $C_{12}H_9Cl_2N_3O$ (282.13): 51.09% C, 3.22% H, 14.89% N; Found: 51.03% C, 3.27% H, 14.91% N. $ClogP = 3.434$; $LogP = 2.53$.

5-*Tert*-butyl-*N*-(3-chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**14**). White solid. Yield 47.7%; m.p. 115.5-116.3°C; IR (cm⁻¹): 3343 (NH), 1680 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.60 (bs, 1H, CONH), 9.38 (s, 1H, H3), 8.61 (s, 1H, H6), 7.86 (s, 1H, H2'), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H5'), 7.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H6'), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.67, 161.01, 142.94, 141.13, 138.96, 136.20, 134.61, 132.14, 131.10, 120.20, 117.88, 37.06, 29.69, 19.50. Anal. Calcd. For C₁₆H₁₈ClN₃O (303.79): 63.26% C, 5.97% H, 13.83% N; Found: 63.31% C, 5.99% H, 13.78% N. Clog*P* = 4.534; Log*P* = 3.76.

6-Chloro-5-*tert*-butyl-*N*-(3-chloro-4-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**15**). White solid. Yield 50.3%; m.p. 117.2-118.6°C; IR (cm⁻¹): 3339 (NH), 1680 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.31 (bs, 1H, CONH), 9.26 (s, 1H, H3), 7.86 (s, 1H, H2'), 7.51 (m, 1H, H5'), 7.29 – 7.12 (m, 1H, H6'), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.55 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.71, 159.77, 145.78, 140.85, 140.25, 135.82, 134.67, 132.56, 131.14, 120.43, 118.11, 39.01, 28.26, 19.56. Anal. Calcd. For C₁₆H₁₇Cl₂N₃O (338.23): 56.82% C, 5.07% H, 12.42% N; Found: 56.78% C, 5.11% H, 12.49% N. Clog*P* = 5.260; Log*P* = 4.66.

N-(5-iodo-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**16**). White solid. Yield 34.7%; m.p. 179.8-182.3 °C; IR (cm⁻¹): 3346 (NH), 1692 (CONH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.29 (s, 1H, CONH), 9.29 (s, 1H, H6'), 8.95 (s, 1H, H3), 8.82 (s, 1H, H5), 8.04 (s, 1H, H6), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 2.23 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.65, 148.20, 144.58, 144.07, 143.59, 137.40, 134.35, 132.73, 132.59, 131.78, 90.70, 17.41. Anal. Calcd. For C₁₂H₁₀IN₃O (339.13): 42.50% C, 2.97% H, 12.39% N; Found: 42.69% C, 2.91% H, 12.34% N. Clog*P* = 2.468; Log*P* = 2.43.

N-(5-iodo-2-methylphenyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**17**). White solid. Yield 42.5%; m.p. 175.3-177.5°C; IR (cm⁻¹): 3337 (NH), 1689 (CONH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.21 (s, 1H, CONH), 9.14 (s, 1H, H6'), 8.69 (s, 1H, H3), 8.04 (s, 1H, H6), 7.49 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 7.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 2.62 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 161.78, 157.73, 143.13, 143.02, 141.85, 137.48, 134.20, 132.59, 132.56, 131.59, 90.70, 21.65, 17.40. Anal. Calcd. For C₁₃H₁₂IN₃O (353.16): 44.21% C, 3.42% H, 11.90% N; Found: 44.19% C, 3.48% H, 11.97% N. Clog*P* = 2.967; Log*P* = 3.14.

6-Chloro-*N*-(5-iodo-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**18**). White solid. Yield 58.9%; m.p. 157.6-159.1°C; IR (cm⁻¹): 3364 (NH), 1686 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.39 (m, 2H, CONH, H3), 8.83 (s, 1H, H5), 8.55 (s, 1H, H6'), 7.45 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 2.35 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.26, 147.75, 143.82, 142.16, 136.09, 134.39, 132.08, 131.44, 130.21, 128.01, 91.05, 17.31. Anal. Calcd. For C₁₂H₉ClIN₃O (373.58): 38.58% C, 2.43% H, 11.25% N; Found: 38.51% C, 2.47% H, 11.23% N. Clog*P* = 3.194; Log*P* = 3.33.

5-*Tert*-butyl-*N*-(5-iodo-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**19**). White solid. Yield 63.3%; m.p. 155.8-156.3°C; IR (cm⁻¹): 3339 (NH), 1689 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.67 (bs, 1H, CONH), 9.39 (s, 1H, H3), 8.68 (s, 1H, H6'), 8.65 (s, 1H, H6), 7.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 6.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.00, 160.92, 142.98, 141.28, 139.16, 136.78, 133.65, 131.93, 131.47, 129.63, 127.18, 91.19, 37.11, 29.72, 17.34. Anal. Calcd. For C₁₆H₁₈IN₃O (395.24): 48.62% C, 4.59% H, 10.63% N; Found: 48.59% C, 4.63% H, 10.60% N. Clog*P* = 4.294; Log*P* = 4.56.

5-*Tert*-butyl-6-chloro-*N*-(5-iodo-2-methylphenyl)pyrazine-2-carboxamide (**20**). White solid. Yield 50.4%; m.p. 133.8-135.2°C; IR (cm⁻¹): 3354 (NH), 1687 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.38 (bs, 1H, CONH), 9.26 (s, 1H, H3), 8.59 (s, 1H, H6'), 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 6.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H3'), 2.35 (s, 3H, CH₃), 1.56 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.84, 159.67, 145.80, 140.91, 140.18, 136.35, 134.10, 132.03, 129.98, 127.76, 91.09, 39.03, 28.25, 17.29. Anal. Calcd. For C₁₆H₁₇ClIN₃O (429.68): 44.72% C, 3.99% H, 9.78% N; Found: 44.74% C, 4.05% H, 9.75% N. Clog*P* = 5.020; Log*P* = 5.46.

N-(4-chloro-2-iodophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**21**). White solid. Yield 77.9%; m.p. 164.5-166.9°C; IR (cm⁻¹): 3274 (NH), 1686 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.16 (bs, 1H, CONH), 9.50 (s, 1H, H3), 8.84 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5), 8.66 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H6), 8.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H6'), 7.82 (s, 1H, H3'), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H5'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 160.99, 147.82, 144.66, 144.07, 142.68, 138.20, 136.74, 130.26, 129.36, 121.74, 89.40. Anal. Calcd. For C₁₁H₇ClIN₃O (359.55): 36.75% C, 1.96% H, 11.69% N; Found: 36.68% C, 1.99% H, 11.63% N. Clog*P* = 2.283; Log*P* = 2.50.

N-(4-chloro-2-iodophenyl)-5-methylpyrazine-2-carboxamide (**22**). White solid. Yield 37.5%; m.p. 192.7-193.9°C; IR (cm⁻¹): 3272 (NH), 1681 (CONH); ¹H NMR (500 MHz,

CDCl₃) δ 10.12 (bs, 1H, CONH), 9.35 (s, 1H, H3), 8.51 (s, 1H, H6), 8.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H H6'), 7.81 (s, 1H, H3'), 7.39 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H5'), 2.70 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 161.35, 157.85, 143.60, 142.49, 141.37, 138.15, 136.90, 130.04, 129.32, 121.69, 89.34, 21.94. Anal. Calcd. For C₁₂H₉ClIN₃O (373.58): 38.58% C, 2.43% H, 11.25% N; Found: 38.54% C, 2.39% H, 11.30% N. Clog*P* = 2.782; Log*P* = 3.21.

6-Chloro-*N*-(4-chloro-2-iodophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**23**). White solid. Yield 17.8%; m.p. 162.2-162.8°C; IR (cm⁻¹): 3274 (NH), 1681 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.95 (bs, 1H, CONH), 9.38 (s, 1H, H3), 8.84 (s, 1H, H5), 8.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H6'), 7.84 (s, 1H, H3'), 7.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H5'); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 159.71, 147.95, 147.65, 143.56, 142.08, 138.29, 136.39, 130.63, 129.42, 121.77, 89.70. Anal. Calcd. For C₁₁H₆Cl₂IN₃O (294.00): 33.53% C, 1.53% H, 10.67% N; Found: 33.54% C, 1.49% H, 10.66% N. Clog*P* = 3.003; Log*P* = 3.41.

5-*Tert*-butyl-*N*-(4-chloro-2-iodophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**24**). White solid. Yield 86.6%; m.p. 167.9-169.4°C; IR (cm⁻¹): 3277 (NH), 1685 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.16 (bs, 1H, CONH), 9.38 (s, 1H, H3), 8.71 (s, 1H, H6), 8.48 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H6'), 7.82 (s, 1H, H3'), 7.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H5'), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.16, 161.44, 142.99, 141.04, 139.40, 138.13, 136.97, 129.96, 129.31, 121.62, 89.26, 37.15, 29.70. Anal. Calcd. For C₁₅H₁₅ClIN₃O (415.66): 43.34% C, 3.64% H, 10.11% N; Found: 43.43% C, 3.59% H, 10.07% N. Clog*P* = 4.109; Log*P* = 4.63.

6-Chloro-5-*tert*-butyl-*N*-(4-chloro-2-iodophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**25**). White solid. Yield 57.8%; m.p. 120.4-121.9°C; IR (cm⁻¹): 3270 (NH), 1685 (CONH); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.94 (bs, 1H, CONH), 9.24 (s, 1H, H3), 8.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H6'), 7.82 (s, 1H, H3'), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H5'), 1.56 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.06, 160.14, 145.94, 140.10, 138.21, 136.62, 131.46, 130.28, 129.35, 121.56, 89.54, 39.07, 28.25. Anal. Calcd. For C₁₅H₁₄Cl₂IN₃O (450.10): 40.03% C, 3.14% H, 9.34% N; Found: 40.00% C, 3.17% H, 9.36% N. Clog*P* = 4.829; Log*P* = 5.53.

References

- Abe, Y., Shigeta, Y., Uchimar, F., Okada, S., & Ozasayama, E. (1969). JP44012898B4.
Dolezal, M., Hartl, J., Miletin, M., Machacek, M., & Kralova, K. (1999). Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.*, 53(2), 126-130.
Venturello, C., & D'Aloisio, R. (1986). EP201934A2.

PŘÍLOHA P4

SERVUSOVÁ, B., P. PATEROVÁ, J. MANDÍKOVÁ, V. KUBÍČEK, R. KUČERA, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2014**, 24(2), 450-453. [ISSN 0960-894X]. IF₂₀₁₂ = 2.338.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation



Barbora Servusová*, Pavla Paterová, Jana Mandíková, Vladimír Kubíček, Radim Kučera, Jiří Kuneš, Martin Doležal, Jan Zitko*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 November 2013

Revised 11 December 2013

Accepted 12 December 2013

Available online 19 December 2013

Keywords:

5-Chloropyrazine-2-carboxamide

6-Chloropyrazine-2-carboxamide

Alkylamines

Antimycobacterial activity

Cytotoxicity

ABSTRACT

A series of pyrazinamide derivatives with alkylamino substitution was designed, synthesized and tested for their ability to inhibit the growth of selected mycobacterial, bacterial and fungal strains. The target structures were prepared from the corresponding 5-chloro (**1**) or 6-chloropyrazine-2-carboxamide (**2**) by nucleophilic substitution of chlorine by various non-aromatic amines (alkylamines). To determine the influence of alkyl substitution, corresponding amino derivatives (**1a**, **2a**) and compounds with phenylalkylamino substitution were prepared. Some of the compounds exerted antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv significantly better than standard pyrazinamide and corresponding starting compounds (**1** and **2**). Basic structure–activity relationships are presented. Only weak antibacterial and no antifungal activity was detected.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

According to the WHO Global Tuberculosis Report 2013 estimates, in 2012 there were 8.6 million new cases of tuberculosis (TB) and 1.3 million deaths associated with TB.¹ Although the absolute number of TB cases per year has been slightly decreasing since the beginning of millennium (decrease from 144 cases per 100,000 population in 2000² to 125 cases per 100,000 population in 2011,³ TB still remains 2nd leading cause of death from an infectious disease worldwide.¹ The situation is worsening due to the co-infection with HIV (1.1 million of all TB cases and 0.32 million of deaths per HIV-associated TB).^{1,4} Another serious problem highlighting the need for new antitubercotics is the increasing number of resistant TB-forms, namely multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB.^{1,4}

5-Chloropyrazine-2-carboxamide (5-Cl-PZA), derived from first-line anti-TB drug pyrazinamide (PZA) and originally prepared by Asai⁵, proved *in vitro* antimycobacterial activity against PZA-sensitive *Mycobacterium tuberculosis* strains (MIC = 8–32 µg/mL) as well as PZA-resistant mycobacterial strains (*Mycobacterium kansasii*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. avium*; MIC = 8–64 µg/mL).⁶ However, 5-Cl-PZA was not active *in vivo* in a chronic murine TB model⁷ (probably due to metabolic instability or poor pharmacokinetics). Its mechanism of action results from the inhibition of fatty acid synthase type I^{8–11} (FAS I,¹² the crucial enzyme participating in the synthesis of mycolic acids, vital components of

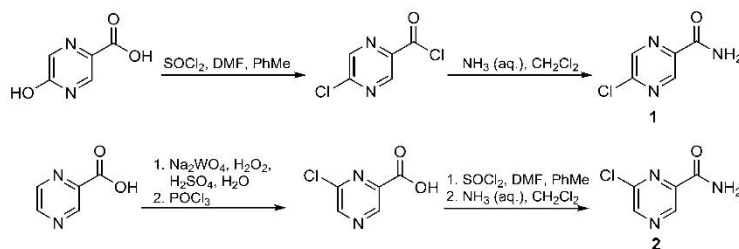
mycobacterial cell wall). The specific mechanism seems to be the competitive displacement of the NADPH cofactor from FAS I.¹³ For this mechanism of action, carboxamido group does not need to be metabolized to carboxylic group. Our attention was focused on substitution of chlorine in 5-Cl-PZA (**1**) by alkylamines. The positive influence of long alkyl chains (C6, C7) on antimycobacterial activity was observed in previous studies on pyrazine derivatives.^{14,15} Long alkyl chains are not a common part of designed or therapeutically used drugs. Nevertheless, recently discovered mycobacterial enoyl-ACP-reductase InhA inhibitors derived from triclosan contained long alkyl chains in their structure.^{16,17} As InhA is located in mitochondria,¹⁸ it is obvious that compounds with long alkyl chains are able to penetrate through mycobacteria outer shell and cell wall, reaching the intracellular compartments.

To compare relationships between substituent's position and activity, the analogous series derived from 6-chloropyrazine-2-carboxamide¹⁹ (**2**, 6-Cl-PZA) was prepared. To study the influence of alkyl chain on activity, simple aliphatic chain was replaced by phenylalkyl chain (compounds **1j**, **1k**, **2j** and **2k**). Amino derivatives (**1a**, **2a**) were prepared as well.

This research project presents the series of 22 compounds, their synthesis, methods and results of biological screening. 5-Cl-PZA was prepared by convenient two-step synthesis using 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (Sigma Aldrich), which was treated with thionyl chloride to form 5-chloropyrazine-2-carbonyl chloride,²⁰ see Scheme 1. The subsequent aminolysis by 25% aq ammonia afforded 5-Cl-PZA as a precipitate, which was separated by filtration. The formation of acyl chloride was catalyzed by

* Corresponding authors. Tel.: +420 495067272; fax: +420 495518002.

E-mail addresses: barbora.servusova@faf.cuni.cz (B. Servusová), jan.zitko@faf.cuni.cz (J. Zitko).

Scheme 1. Synthesis of starting compounds **1** and **2**.

N,N-dimethylformamide (DMF).²¹ Synthesis of 6-Cl-PZA was carried out analogously from 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid²² obtained from pyrazine-carboxylic acid via *N*-oxide²³ and its subsequent chlorination with phosphoryl chloride.²⁴ Final structures were prepared from chloro-pyrazinamide (**1** or **2**) by means of nucleophilic substitution of chlorine by aliphatic alkylamines or phenylalkyl amines, see Scheme 2. Different approach was applied for the synthesis of amino compounds **1a**²⁵ and **2a**,²⁶ where the microwave irradiation was used to accelerate the aminodehalogenation reaction (described in Supplementary data). Synthesis and antimycobacterial activity of 6-methylaminopyrazine-2-carboxamide (**2b**) was previously published by Foks and co-workers²⁷ (added to Table 1 for clarity).

All compounds (including standards PZA, INH and starting compounds 5-Cl-PZA = **1** and 6-Cl-PZA = **2**) were screened for antimycobacterial activity against four mycobacterial strains (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* 235/80, *M. avium* 80/72 and *M. avium* 152/73) by microplate alamar blue assay (MABA)²⁸ at pH = 5.6 (conditions optimized for PZA).²⁹ Results were expressed as minimal inhibitory concentration (MIC) in µg/mL, data in parentheses represent the MIC values with respect to molecular weight in µM (Table 1). The MIC values for 5-Cl-PZA (**1**, MIC = 50 µg/mL) were approximately in accordance with previously published data (MIC = 8–32 µg/mL).⁵

In the presented series, the substitution of chlorine with long alkylamine chain (heptyl, octyl) led to a significant increase in antimycobacterial activity and thereby also confirmed the previously reported positive influence^{14,15} of long alkyl chains on antimycobacterial activity. Besides increased lipophilicity, this effect might also be mediated by facilitated transport through mycobacterial cell wall, via interaction of long carbon chains of mycolic acids with alkyl chains of discussed compounds. Taking into account molecular weight (MIC values converted to molar concentration µM), 6-octylaminopyrazine-2-carboxamide (**2i**, MIC = 6 µM) was significantly more active (up to 100-fold) against *M. tuberculosis* H37Rv than corresponding starting compound 6-Cl-PZA (**2**, MIC = 635 µM), see Table 1. This compound **2i** also exhibited activity against all PZA-resistant strains (MIC = 25 µg/mL i.e. 100 µM).

In the series derived from 5-Cl-PZA (**1**), heptylamino (**1h**, MIC = 53 µM) and octylamino (**1i**, MIC = 25 µM) derivatives also

exhibited significant increase in activity against *M. tuberculosis* H37Rv compared to starting compound **1** (MIC = 317 µM). Remarkably, the activity of **1h** (MIC = 53 µM) and **1i** (MIC = 25 µM) against *M. kansasii* was slightly better than activity of 5-Cl-PZA (**1**, MIC = 79 µM). Within all compounds, the activity of octylamino derivatives (MIC = 6–25 µM) against *M. tuberculosis* H37Rv was significantly higher compared to the activity of therapeutically used PZA (MIC = 102–205 µM).

Insertion of aromatic nucleus into the aliphatic chain (**1j**, **1k**, **2j** and **2k**) led either to decrease or complete loss of activity. Derivatives with amino substitution or with shorter alkylamino chain (methyl to pentylamino subst.) were completely inactive against all tested strains. Lack of activity of compounds **1a–f** and **2a–f** could be possibly caused by low lipophilicity and/or poor ability to penetrate lipophilic mycobacterial cell wall. Except for compounds with phenylalkylamino substitution (**1j**, **1k**, **2j**, **2k**), no significant differences in activity were observed between 5-alkylamino series and their 6-alkylamino isomers.

Lipophilicity is an important (but not the only) determinant of antimycobacterial activity in presented homologous series. Steric effects, possible interactions of amino moiety as well as flexibility of alkyl chain play important role. However, some dependence of antimycobacterial activity on lipophilicity can be observed. Graph 1 reveals significant correlation ($r = 0.8558$; $P = 0.0016$; $R^2 = 0.7323$; $n = 10$) of antimycobacterial activity expressed as log (1/MIC) in molar concentration on lipophilicity (log *k*) for compounds with detected MIC.

As seen from Graph 1, most of the compounds with significant antimycobacterial activity (MIC ≤ 25 µg/mL) had lipophilicity log *k* ≥ 0.3. In our system this value corresponds approximately to Clog *P* about 3.0. For the sake of completeness, values for 5-Cl-PZA (**1**) and 6-Cl-PZA (**2**) were added to the graph.

In vitro hepatotoxicity assay was performed for compounds with MIC ≤ 12.5 µg/mL (**1h**, **1i** and **2i**), PZA and starting compounds **1** and **2**. The decrease of viability of human liver HepG2 cells was measured using standard colorimetric assay based on the reduction of tetrazolium.^{30,31} Results were expressed as IC₅₀. The course of the toxicity curves of PZA, **1h** and **1i** did not allow a valid calculation of IC₅₀ due to the limited solubility in the cell culture medium. Thus, only an estimate of toxic concentrations could be determined for these compounds. According to HepG2 cytotoxicity, the studied compounds can be divided in two groups. The first group includes compound **2i** having intermediate toxicity in HepG2 cells. The second group is formed by relatively *in vitro* non-toxic compounds **1**, **2** and PZA as well as **1h** and **1i**, see Table 2. Selectivity index (SI) defined as IC₅₀/MIC in molar concentrations was calculated for antimycobacterial activity against *M. tuberculosis*.

SI values over 10 are considered as safe for a drug candidate, granting the sufficient difference between efficient and cytotoxic concentrations. Compounds with octylamino substitution (**1i** and **2i**) possessed SI > 10. The difference between cytotoxicity of 5-Cl-PZA (**1**) and 6-Cl-PZA (**2**) could be caused by altered

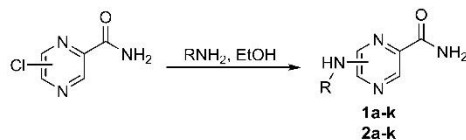
Scheme 2. Synthesis of final compounds **1a–k** and **2a–k**. Reagents and conditions: alkylamines (in the range from methyl to octylamine) or phenyl alkylamines were refluxed in EtOH for 6 h; **1a**, **2a**: 25% aq. ammonia, MW.

Table 1

Summary of prepared compounds. Their antimycobacterial activity (detected at pH = 5.6) expressed as minimal inhibition concentration (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ or with respect to molecular weight of compounds in μM . Comparison of calculated lipophilicity parameter (ClogP) with determined $\log k$ values.

No.	Structure	MW	Antimycobacterial activity ($\mu\text{g/mL}$) (μM)				Lipophilicity	
			<i>M. tbc</i> H37Rv ^a	<i>M. kansasii</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c	<i>M. avium</i> ^d	$\log k$	ClogP
1a	H	138.13	>100	>100	>100	>100	-0.7852	-0.6797
1b	Methyl	152.15	>100	>100	>100	>100	-0.6878	0.1466
1c	Ethyl	166.18	>100	>100	>100	>100	-0.5520	0.6756
1d	Propyl	180.21	>100	>100	>100	>100	-0.3878	1.2046
1e	Butyl	194.23	>100	>100	>100	>100	-0.1910	1.7336
1f	Pentyl	208.26	>100	>100	>100	>100	0.0181	2.2626
1g	Hexyl	222.29	50 (225)	100	>100	>100	0.2389	2.7916
1h	Heptyl	236.31	12.5 (53)	12.5 (53)	>100	>100	0.4658	3.3206
1i	Octyl	250.34	6.25 (25)	6.25 (25)	>100	>100	0.6930	3.8496
1j	2-Phenylethyl	242.28	50 (206)	100	>100	>100	-0.0382	2.2436
1k	3-Phenylpropyl	256.30	25 (98)	100	>100	>100	0.1408	2.6226
2a	H	138.13	>100	>100	>100	>100	-0.7814	-0.6797
2b	Methyl	152.15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	0.1466
2c	Ethyl	166.18	>100	>100	>100	>100	-0.6318	0.6756
2d	Propyl	180.21	>100	>100	>100	>100	-0.4386	1.2046
2e	Butyl	194.23	100	>100	>100	>100	-0.2162	1.7336
2f	Pentyl	208.26	100	>100	>100	>100	-0.0095	2.2626
2g	Hexyl	222.29	100	>100	>100	>100	0.2051	2.7916
2h	Heptyl	236.31	25 (106)	50 (212)	100	100	0.4273	3.3206
2i	Octyl	250.34	1.56 (6)	25 (100)	25 (100)	25 (100)	0.6514	3.8496
2j	2-Phenylethyl	242.28	>100	>100	>100	>100	-0.0986	2.2436
2k	3-Phenylpropyl	256.30	>100	>100	>100	>100	0.0741	2.6226
1 = 5-Cl-PZA		157.56	50 (317)	12.5 (79)	>100	>100	-0.3891	0.0613
2 = 6-Cl-PZA		157.56	100 (635)	>100	>100	>100	-0.4165	0.0613
PZA		123.11	12.5–25 (102–205)	>100	>100	>100	-0.6872	-0.6763
INH		137.14	0.39–1.56 (3–11)	1.56–6.25 (11–46)	12.5	6.25	-0.7432	-0.6680

Numbers in parentheses represent the MIC values converted to molar concentrations (μM) n.a. data not available n.d. not determined.

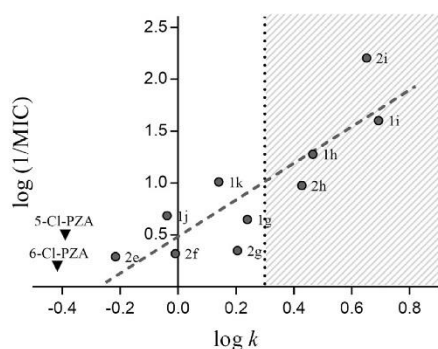
CNCTC = Czech National Collection of Type Cultures.

^a CNCTC My 331/88.

^b CNCTC My 235/80.

^c CNCTC My 80/72.

^d CNCTC My 152/73.



Graph 1. Correlation of antimycobacterial activity on experimentally measured $\log k$ values. Inactive compounds, for which no exact value of MIC was detected (MIC > 100 $\mu\text{g/mL}$), were omitted. 5-Cl-PZA and 6-Cl-PZA were not included in the correlation. The striped region represents desired lipophilicity values with respect to activity. Correlation parameters: $r = 0.8558$; $P = 0.0016$; $R^2 = 0.7323$; $n = 10$.

biodegradation. PZA derivatives are metabolized *via* xanthine oxidase and aldehyde oxidase to form 5-hydroxy derivatives.³³ We might hypothesize that 5-chloro substitution interferes with the hydroxylation process.

For all tested compounds and strains, only weak antibacterial activity was found for compound **2g** (*Staphylococcus epidermidis* H 6966/08; MIC = 62.5 μM), for further details see [Supplementary data](#). The rest of tested compounds were inactive even in highest concentrations used in the testing, which were 500 μM .

Table 2

Cytotoxicity of selected compounds in HepG2 cells

No.	HepG2		<i>M. tbc</i> H37Rv	
	IC ₅₀ (μM)	SI	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MIC (μM)
1h	>250 ^a	>4.7	12.5	53
1i	>250 ^a	>10.0	6.25	25
2i	161	25.8	1.56	6
1 = 5-Cl-PZA	1.6×10^3	5.0	50	317
2 = 6-Cl-PZA	3.5×10^3	5.5	100	635
PZA ^a	$>1 \times 10^4$	>98.1	12.5	102

^a Testing in higher concentration was limited due to the solubility of the tested compounds.

^a PZA IC₅₀ = 79.1 mM, data from literature.³²

Concerning the mechanism of action, PZA acts mainly as a prodrug, which is enzymatically hydrolysed *via* mycobacterial pyrazinamidase (PncA, EC 3.5.1.19) to form pyrazinoic acid (POA).³⁴ On the other hand, some PZA derivatives proved to be active in non-hydrolysed carboxamide form; for example, 5-Cl-PZA as a FAS I inhibitor.^{6,8,9,11,13} 5-Cl-PZA possessed *in vitro* activity against mycobacterial strains with low pyrazinamidase activity as well.⁷ To elucidate, whether the most active alkylamino derivatives of PZA could undergo hydrolysis by PncA or rather function in non-hydrolysed form, a docking study was performed.

Crystallographic structure of PncA was recently described in detail.³⁵ The substrate binding cavity in PncA is a narrow crevice (approximately $10 \times 7 \text{ \AA}$) containing catalytic triad made of residues Lys96, Asp8 and Cys138. On the opposite site of the crevice, three histidine residues (His51, His57 and His71) and Asp49 hold the Fe ion on. According to the orientation of PZA needed for its catalytic conversion as described in literature,³⁵ the substituents

on C5 and C6 of the pyrazine nucleus would protrude towards the end of the cavity formed by the Trp68. The distance between the PZA ring and the Trp68 plane is approximately 4–5 Å (see [Supplementary data](#)), which is little space to accommodate any larger substituent. Therefore, we expected that the 5-alkylamino and 6-alkylaminopyrazine-2-carboxamides with longer alkyl chains would have to be displaced from the position needed for the catalytic transformation. This was confirmed by docking study described in [Supplementary data](#). To conclude, neither 5-alkylamino nor 6-alkylamino derivatives of PZA will be converted to corresponding carboxylic acids by the PncA.

New series of 5-alkylamino and 6-alkylaminopyrazine-2-carboxamides were synthesized, characterized by analytical data and screened for antimycobacterial activity. 6-Octylamino-pyrazine-2-carboxamide (**2i**) showed the highest activity against *M. tuberculosis* H37Rv (MIC = 1.56 µg/mL i.e. 6 µM), broadest spectrum of activity as well as highest selectivity index for *M. tuberculosis* H37Rv (SI = 25.8) within all compounds. Based on the results, we presume 6-octylaminopyrazine-2-carboxamide (**2i**, 100-fold more active than 6-Cl-PZA) could serve as model structure for further modifications. Presented study also confirmed the previously reported positive influence of long alkylamino chains on antimycobacterial activity.

Acknowledgments

This work was financially supported by GAUK B-CH/710312, IGA NT 13346 (2012) and SVV-2013-267-001. The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235, the title of the project: TEAB.

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.054>.

References and notes

- World Health Organization. Global Tuberculosis, Report 2013. WHO/HTM/TB/2013.11.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO, Report 2002. WHO/CDS/TB/2002.295.
- World Health Organization. Global Tuberculosis, Report 2012. WHO/HTM/TB/2012.6.
- Goletti, D.; Weissman, D.; Jackson, R. W.; Graham, N. M.; Vlahov, D.; Klein, R. S.; Munsiff, S. S.; L'Ortona, L.; Cauda, R.; Fauci, A. S. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1271.
- Asai, M. *Yakugaku Zasshi* **1961**, *81*, 1475.
- Cynamon, M. H.; Speirs, R. J.; Welch, J. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 462.
- Ahmad, Z.; Tyagi, S.; Minkowski, A.; Almeida, D.; Nuermberger, E. L.; Peck, K. M.; Welch, J. T.; Baughn, A. D.; Jacobs, W. R., Jr.; Grosset, J. H. *Indian J. Med. Res.* **2012**, *136*, 808.
- Zimhony, O.; Cox, J. S.; Welch, J. T. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043.
- Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Barry, C. E. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2167.
- Zimhony, O.; Vilcheze, C.; Arai, M.; Welch, J. T.; Jacobs, W. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 752.
- Ngo, S.; Zimhony, O.; Chung, W. J.; Sayahi, H.; Jacobs, W. R.; Welch, J. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 2430.
- Brennan, P. J. *Tuberculosis* **2003**, *83*, 91.
- Sayahi, H.; Pugliese, K. M.; Zimhony, O.; Jacobs, W. R., Jr.; Shekhtman, A.; Welch, J. T. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2582.
- Zitko, J.; Doležal, M.; Svobodová, M.; Vejsová, M.; Kuneš, J.; Kučera, R.; Jilek, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1471.
- Zitko, J.; Jampilek, J.; Dobrovolný, L.; Svobodová, M.; Kuneš, J.; Doležal, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1598.
- Freundlich, J. S.; Wang, F.; Vilcheze, C.; Gulten, G.; Langley, R.; Schiehsler, G. A.; Jacobs, D. R.; Jacobs, W. R.; Sacchettini, J. C. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 241.
- Luckner, S. R.; Liu, N.; am Ende, C. W.; Tonge, P. J.; Kisker, C. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14330.
- Hiltunen, J. K.; Schonauer, M. S.; Autio, K. J.; Mittelmeier, T. M.; Kastaniotis, A. J.; Dieckmann, C. L. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9011.
- Bernardi, L.; Palamidessi, G.; Leone, A.; Larini, G. *Gazz. Chim. Ital.* **1961**, *91*, 1431.
- Matulenko, M. A.; Lee, C. H.; Jiang, M.; Frey, R. R.; Cowart, M. D.; Bayburt, E. K.; DiDomenico, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3705.
- Clayden, J. *Org. Chem.*; Oxford University Press: Oxford, 2008.
- Abe, H.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F.; Okada, S.; Ozasayma, E. Methyl 6-methoxyppyrazine-2-carboxylate. JP Patent 44012898, 1969; *Chem. Abstr.* **1969**, *71*, 112979y.
- Montedison S.p.A. Process for the preparation of 2-carboxypyrazines 4-oxide. Patent EP0201934, 1986.
- Palamidessi, G.; Vigevani, A.; Zarini, F. *J. Heterocycl. Chem.* **1974**, *11*, 607.
- Ellingson, R. C.; Henry, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2798.
- Abe, H.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F.; Okada, S.; Ozasayma, E. Substituted pyrazinecarboxamide derivatives. JP Patent 46037596, 1971.
- Foks, H.; Pancechowska, D.; Sawlewicz, J.; Buraczewska, M.; Manowska, W. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1974**, *26*, 537.
- Franzblau, S. G.; Witzig, R. S.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M. T.; Cook, M. B.; Quenzer, V. K.; Ferguson, R. M.; Gilman, R. H. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362.
- Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H.; Sun, Z. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2044.
- Promega Corporation. CellTiter 96® Aqueous one solution cell proliferation assay. Owen, T. C. U.S. Patent, 5185, 450, 1993.
- Kratky, M.; Vinsova, J.; Volkova, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolarikova, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 433.
- Tostmann, A.; Boeree, M. J.; Peters, W. H. M.; Roelofs, H. M. J.; Aarnoutse, R. E.; van der Ven, A.; Dekhuijzen, P. N. R. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *23*, 577.
- Lacroix, C.; Hoang, T. P.; Nouveau, J.; Guyonnaud, C.; Laine, G.; Duwoos, H.; Lafont, O. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *36*, 395.
- Konno, K.; Feldmann, F. M.; McDermott, W. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461.
- Petrella, S.; Gelus-Ziental, N.; Maudry, A.; Laurans, C.; Boudjelloul, R.; Sougakoff, W. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15785.

Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation

Barbora Servusová^{a,*}, Pavla Paterová^a, Jana Mandíková^a, Vladimír Kubiček^a, Radim Kučera^a, Jiří Kuneš^a, Martin Doležal^a and Jan Zitko^{a,*}

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

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Experimental

1. General

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). All organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. The reaction processes were monitored using Merck Silica 60 F254 TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were purified using an automated chromatograph CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040–0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany); gradient elution (hexane/ethyl-acetate), detection wavelength 260 nm, monitor wavelength 280 nm. NMR analysis was performed on Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C or for comp. **2f**, **2i** and **2k** on Varian Mercury-Vx BB 500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). IR spectra were measured in ATR mode using a Ge crystal-plate on Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA). The mass spectra were recorded in the mixture of MeOH, H₂O, formic acid (80:20:0.02 v/v) using LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The electrospray ionisation was performed in the positive mode. Melting points were determined on Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected. The synthesis of comp. **1a** and **2a** took place in microwave reactor with focused field CEM Discover (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) connected with autosampler Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) and equipped with CEM's Synergy™ software for monitoring the reaction progress.

2. General synthetic procedures

2.1. Synthesis of final compounds 1b-1k and 2b-2k

150 mg (0.952 mmol) of 5-Cl-PZA (**1**) or 6-Cl-PZA (**2**) was dissolved in ethanol together with triethylamine (1 eq., 96 mg, 0.952 mmol). Three equivalents of corresponding alkylamine were added to the reaction mixture and refluxed in ethanol generally for 6 hours. The completion of the reaction was checked by TLC chromatography (eluent: hexane/ethyl acetate, 1:2). The crude product was absorbed on silica by solvent evaporation and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate gradient elution).

2.2. Microwave assisted synthesis (1a, 2a)

Comp. **1a** and **2a** were prepared using microwave reactor. Special thick-walled tubes intended for use in microwave reactor were filled with a mixture of corresponding starting comp. **1** or **2** (150 mg, 0.952 mmol), 25% aqueous ammonia (2 mL, in excess) and MeOH (2 mL). Tubes fitted with stirrer and closed with a special cap were inserted into the reactor. Reaction conditions for microwave-assisted synthesis were: output 200 W, temperature 95 °C, reaction time 30 min using PowerMAX mode.

3. Analytical data of prepared compounds

5-Chloropyrazine-2-carboxamide (**1**). 5.0 g of 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (0.036 mol) was suspended in 50 mL of dry toluene and treated with thionyl chloride (3 eq., 7.9 mL, 0.108 mol). DMF (10 drops) was added to the reaction mixture as a catalyst. The reaction mixture was heated to reflux for about 1 h. The excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with dry toluene in vacuo. The crude acyl chloride was dissolved in 50 mL of dichloromethane and excess of aqueous solution of ammonia (m/m, 25%, 10 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Undissolved white product was separated by filtration. Analytical data in accordance to literature. White solid. Yield: 73 %; m.p. 200.1-201.3 °C; IR (cm⁻¹) 3407, 3181, 1692; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.97 (s, 1H, H3), 8.83 (s, 1H, H6), 8.26 (bs, 1H, CONH₂), 7.89 (bs, 1H, CONH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.3, 150.8, 144.0, 143.7, 143.3; MS (ESI, Pos.): m/z 157.96 (M+H)⁺.

5-Aminopyrazine-2-carboxamide (**1a**). Prepared according to microwave assisted synthesis (see Section 2.2.). Analytical data in accordance to literature. White solid. Yield: 49 %; m.p. 269.3-272.0 °C (decomp.); IR (cm⁻¹) 3451, 3411, 3201, 1709; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.47 (s, 1H, H3), 7.80 (d, 1H, *J*=1.8 Hz, H6), 7.65 (bs, 1H, CONH₂), 7.27 (bs, 1H, CONH₂), 7.04 (bs, 2H, NH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.1, 157.5, 142.7, 133.1, 130.3; MS (ESI, Pos.): m/z 138.93 (M+H)⁺.

5-Methylaminopyrazine-2-carboxamide (**1b**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.) with following changes applied. 5 mL of 30% (m/m) aqueous solution of methylamine was placed to a flask slightly heated to approx. 40 °C. Gaseous methylamine was produced by discontinuous adding of 10% (m/m, aq solution) KOH. The gas was dried by

waterless K_2CO_3 and let to bubble through the reaction mixture. White solid. Yield: 85 %; m.p. 227.9-228.4 °C; IR (cm^{-1}) 3250, 3149, 1671, 1573; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.53 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.69 – 7.57 (m, 2H, NH_2 , NH), 7.27 (bs, 1H, NH_2), 2.84 (d, J = 4.8 Hz, 3H, NCH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.23, 156.63, 142.48, 132.42, 131.17, 27.49; MS (ESI, Pos.): m/z 152.92 (M+H) $^+$.

5-Ethylaminopyrazine-2-carboxamide (**1c**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.) with following changes applied. 5 mL of liquid ethylamine (Bp 16.6 °C) was placed into flask cooled with ice. The flask was let to warm up slowly. The vapours of ethylamine were dried by waterless K_2CO_3 and let to bubble through the reaction mixture. White solid. Yield: 47 %; m.p. 214.9-216.5 °C; IR (cm^{-1}) 3373, 3175, 1649, 1573; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.51 (s, 1H, H3), 7.83 (s, 1H, H6), 7.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.59 (bs, 1H, NH_2), 7.25 (bs, 1H, NH_2), 3.38 – 3.24 (m, 2H, NCH_2), 1.14 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.18, 156.00, 142.46, 132.40, 131.19, 35.27, 14.40; MS (ESI, Pos.): m/z 166.92 (M+H) $^+$.

5-Propylaminopyrazine-2-carboxamide (**1d**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 59 %; m.p. 168.8-169.6 °C; IR (cm^{-1}) 3255, 3168, 1650, 1572; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.51 (s, 1H, H3), 7.85 (s, 1H, H6), 7.67 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.62 (bs, 1H, NH_2), 7.26 (bs, 1H, NH_2), 3.31 – 3.21 (m, 2H, NCH_2), 1.63 – 1.45 (m, 2H, CH_2), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.19, 156.20, 142.43, 132.36, 131.22, 42.23, 22.02, 11.65; MS (ESI, Pos.): m/z 180.93 (M+H) $^+$.

5-Butylaminopyrazine-2-carboxamide (**1e**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 61 %; m.p. 138.7-139.4 °C; IR (cm^{-1}) 3326, 3219, 1648, 1575; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.65 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.62 (bs, 1H, NH_2), 7.25 (bs, 1H, NH_2), 3.34 – 3.25 (m, 2H, NCH_2), 1.57 – 1.45 (m, 2H, CH_2), 1.41 – 1.26 (m, 2H, CH_2), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.18, 156.17, 142.43, 132.34, 131.25, 40.10, 30.85, 19.84, 13.88; MS (ESI, Pos.): m/z 194.96 (M+H) $^+$.

5-Pentylaminopyrazine-2-carboxamide (**1f**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 33 %; m.p. 155.7-156.9 °C; IR (cm^{-1}) 3274, 3177, 1658, 1583; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.66 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.61 (bs, 1H, NH_2), 7.25 (bs, 1H, NH_2), 3.36 – 3.24 (m, 2H, NCH_2), 1.60 – 1.45 (m, 2H, CH_2), 1.38 – 1.21 (m, 4H, CH_2), 0.86 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.16, 156.15, 142.42, 132.33, 131.26, 40.38, 28.86, 28.42, 22.08, 14.10; MS (ESI, Pos.): m/z 208.98 (M+H) $^+$.

5-Hexylaminopyrazine-2-carboxamide (**1g**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 57 %; m.p. 126.5-128.3 °C; IR (cm^{-1}) 3319, 3174, 1651, 1577; 1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.67 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.61 (bs, 1H, NH_2), 7.25 (bs, 1H, NH_2), 3.35 – 3.24 (m, 2H, NCH_2), 1.58 – 1.45 (m, 2H, CH_2), 1.38 – 1.20 (m, 6H, CH_2), 0.85 (t, J = 6.4 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 166.17, 156.16, 142.42, 132.33, 131.23, 40.42, 31.22, 28.71, 26.36, 22.27, 14.10; MS (ESI, Pos.): m/z 222.99 (M+H)⁺.

5-Heptylamino-pyrazine-2-carboxamide (**1h**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 82 %; m.p. 139.2-140.1 °C; IR (cm⁻¹) 3385, 3178, 1632, 1578; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.64 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH), 7.60 (bs, 1H, NH₂), 7.24 (bs, 1H, NH₂), 3.34 – 3.23 (m, 2H, NCH₂), 1.59 – 1.44 (m, 2H, CH₂), 1.38 – 1.17 (m, 8H, CH₂), 0.84 (t, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.16, 156.15, 142.41, 132.33, 131.16, 40.40, 31.42, 28.73, 28.63, 26.63, 22.22, 14.10; MS (ESI, Pos.): m/z 237.01 (M+H)⁺.

5-Octylamino-pyrazine-2-carboxamide (**1i**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 87 %; m.p. 137.3-138.4 °C; IR (cm⁻¹) 3322, 3168, 1650, 1575; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (s, 1H, H3), 7.84 (s, 1H, H6), 7.64 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.60 (bs, 1H, NH₂), 7.24 (bs, 1H, NH₂), 3.34 – 3.23 (m, 2H, NCH₂), 1.59 – 1.44 (m, 2H, CH₂), 1.37 – 1.15 (m, 10H, CH₂), 0.83 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.16, 156.15, 142.41, 132.32, 131.21, 40.39, 31.40, 28.92, 28.83, 28.72, 26.66, 22.25, 14.09; MS (ESI, Pos.): m/z 251.03 (M+H)⁺.

5-(2-Phenylethyl)amino-pyrazine-2-carboxamide (**1j**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 80 %; m.p. 139.3-140.5 °C; IR (cm⁻¹) 3433, 3312, 1647, 1575; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.53 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H3), 7.85 (d, 1H, J = 1.4 Hz, H6), 7.76 (t, 1H, J = 6.6 Hz, NH), 7.63 (bs, 1H, NH₂), 7.32-7.13 (m, 6H, H2', H3', H4', H5', H6'), 3.55 (q, 2H, J = 6.6 Hz, NCH₂), 2.84 (t, 2H, J = 6.6 Hz, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.2, 154.1, 142.4, 139.6, 132.6, 131.3, 128.9, 128.5, 126.3, 42.0, 34.8; MS(ESI, Pos.): m/z 242.94 (M+H)⁺.

5-(3-Phenylpropyl)amino-pyrazine-2-carboxamide (**1k**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 83 %; m.p. 115.8-116.7 °C; IR (cm⁻¹) 3348, 2937, 1682, 1573; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (d, 1H, J = 1.2 Hz, H3), 7.86 (d, 1H, J = 1.2 Hz, H6), 7.73 (t, 1H, J = 6.5 Hz, NH), 7.62 (bs, 1H, NH₂), 7.31-7.10 (m, 6H, H2', H3', H4', H5', H6'), 3.37-3.24 (m, 2H, NCH₂), 2.64 (t, 3H, J = 6.5 Hz, CH₂), 1.91-1.76 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.2, 156.2, 142.4, 141.8, 132.5, 131.8, 131.3, 128.5, 125.9, 40.1, 32.7, 30.5 ; MS (ESI, Pos.): m/z 256.97 (M+H)⁺.

6-Chloropyrazine-2-carboxamide (**2**). Prepared similar to the synthesis of 5-Cl-PZA (**1**) with following changes applied: 5.0 g of 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (0.031 mol) was suspended in 50 mL of dry toluene and treated with thionyl chloride (3 eq., 6.7 mL, 0.093 mol). Analytical data in accordance to literature. White solid. Yield: 80 %; m.p. 172.6-173.1 °C; IR (cm⁻¹) 3322, 3157, 1708; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.15 (s, 1H, H3), 8.99 (s, 1H, H5), 8.15 (bs, 1H, CONH₂), 7.96 (bs, 1H, CONH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.9, 147.3, 147.1, 145.1, 142.0; MS (ESI, Pos.): m/z 157.97 (M+H)⁺.

6-Aminopyrazine-2-carboxamide (**2a**). Prepared according to microwave assisted synthesis (see Section 2.2.). Analytical data in accordance to literature. White solid. Yield: 54 %; m.p. 199.5-201.2 °C; IR (cm⁻¹) 3457, 3407, 3202, 1708; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (s, 1H, H3), 8.02 (s, 1H, H5), 7.62 (bs, 2H, CONH₂), 7.04 (bs, 2H, NH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.1, 154.6, 142.3, 135.7, 130.2; MS (ESI, Pos.): m/z 138.93 (M+H)⁺.

6-Ethylaminopyrazine-2-carboxamide (**2c**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.) with following changes applied. 5 mL of liquid ethylamine (Bp 16.6 °C) was placed into flask cooled with ice. The flask was let to warm up slowly. The vapours of ethylamine were dried by waterless K₂CO₃ and let to bubble through the reaction mixture. White solid. Yield: 63 %, m.p. 201.4-202.7 °C; IR (cm⁻¹) 3408, 3195, 1648, 1567; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.01 (s, 1H, H5), 7.83 (bs, 1H, NH₂), 7.59 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, 1H, *J*=6.2 Hz, NH), 3.41-3.30 (m, 2H, NCH₂), 1.13 (t, 3H, *J*=6.2 Hz, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.2, 153.7, 141.4, 136.5, 129.1, 34.9, 14.5; MS ESI, Pos.): m/z 167.02 (M+H)⁺.

6-Propylaminopyrazine-2-carboxamide (**2d**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 48 %; m.p. 159.9-160.7 °C; IR (cm⁻¹) 3329, 3181, 1679, 1593; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H5), 7.81 (bs, 1H, NH₂), 7.60 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 3.38 – 3.28 (m, 2H, NCH₂), 1.57 – 1.46 (m, 2H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.19, 153.83, 141.88, 136.47, 129.04, 40.13, 21.18, 13.89; MS (ESI, Pos.): m/z 181.05 (M+H)⁺.

6-Butylaminopyrazine-2-carboxamide (**2e**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 91 %; m.p. 137.6-138.9 °C; IR (cm⁻¹) 3321, 3178, 1676, 1593; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.04 (s, 1H, H5), 7.82 (bs, 1H, NH₂), 7.61 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, NH), 3.39 – 3.28 (m, 2H, NCH₂), 1.57 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.42 – 1.28 (m, 2H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.22, 153.82, 141.88, 136.48, 129.04, 40.25, 31.05, 19.88, 13.96; MS (ESI, Pos.): m/z 195.09 (M+H)⁺.

6-Pentylaminopyrazine-2-carboxamide (**2f**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 73 %; m.p. 156.3-157.5 °C; IR (cm⁻¹) 3338, 3189, 1686, 1594; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H5), 7.81 (bs, 1H, NH₂), 7.59 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.35 – 3.29 (m, 2H, NCH₂), 1.57 – 1.48 (m, 2H, CH₂), 1.37 – 1.27 (m, 4H, CH₂), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 166.21, 153.80, 141.87, 136.47, 129.04, 40.01, 28.93, 28.57, 22.10, 14.12; MS (ESI, Pos.): m/z 209.09 (M+H)⁺.

6-Hexylaminopyrazine-2-carboxamide (**2g**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 33 %; m.p. 122.6-124.1 °C; IR (cm⁻¹) 3337, 3203, 1686, 1593; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H5), 7.81 (bs, 1H, NH₂), 7.61 (bs, 1H, NH₂), 7.28 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.37 – 3.28 (m, 2H, NCH₂), 1.58 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.39 – 1.16 (m, 6H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO)

δ 166.22, 153.81, 141.87, 136.49, 129.03, 40.04, 31.26, 28.88, 26.41, 22.31, 14.10; MS (ESI, Pos.): m/z 223.10 (M+H)⁺.

6-Heptylamino-pyrazine-2-carboxamide (**2h**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 44 %; m.p. 131.8-133.3 °C; IR (cm⁻¹) 3340, 3204, 1686, 1593; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.16 (s, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H5), 7.81 (bs, 1H, NH₂), 7.61 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 3.37 – 3.27 (m, 2H, NCH₂), 1.57 – 1.45 (m, 4H, CH₂), 1.38 – 1.16 (m, 6H, CH₂), 0.84 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.33, 153.81, 141.87, 136.48, 129.03, 40.26, 31.49, 28.92, 28.70, 26.70, 22.25, 14.14; MS (ESI, Pos.): m/z 237.18 (M+H)⁺.

6-Octylamino-pyrazine-2-carboxamide (**2i**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 32 %; m.p. 119.1-120.8 °C; IR (cm⁻¹) 3392, 3248, 1673, 1589; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.15 (s, 1H, H3), 8.03 (s, 1H, H5), 7.81 (bs, 1H, NH₂), 7.60 (bs, 1H, NH₂), 7.27 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 3.35 – 3.28 (m, 2H, NCH₂), 1.57 – 1.47 (m, 2H, CH₂), 1.37 – 1.19 (m, 10H, CH₂), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 166.19, 153.80, 141.86, 136.46, 129.01, 40.28, 31.41, 28.97, 28.89, 28.88, 26.71, 22.26, 14.12; MS (ESI, Pos.): m/z 251.15 (M+H)⁺.

6-(2-Phenylethyl)amino-pyrazine-2-carboxamide (**2j**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 78 %; m.p. 158.3-159.7 °C; IR (cm⁻¹) 3400, 3279, 1671, 1588; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.17 (s, 1H, H3), 8.04 (s, 1H, H5), 7.85 (bs, 1H, NH₂), 7.62 (bs, 1H, NH₂), 7.39 (t, 1H, J = 6.4 Hz, NH), 7.31-7.13 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 3.59 (q, 2H, J = 6.4 Hz, NCH₂), 2.84 (t, 3H, J = 6.4 Hz, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.2, 153.7, 142.0, 139.8, 136.5, 129.3, 129.0, 128.4, 126.2, 41.5, 35.0; MS (ESI, Pos.): m/z 243.04 (M+H)⁺.

6-(3-Phenylpropyl)amino-pyrazine-2-carboxamide (**2k**). Prepared according to the general procedure (see Section 2.1.). White solid. Yield: 61 %; m.p. 82.1-83.7 °C; IR (cm⁻¹) 3331, 2933, 1686, 1593; ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.17 (s, 1H, H3), 8.05 (s, 1H, H5), 7.72 (bs, 1H, NH₂), 7.61 (bs, 1H, NH₂), 7.38 (t, 1H, J = 6.7 Hz, NH), 7.30-7.24 (m, 2H, H3', H5'), 7.24-7.19 (m, 2H, H2', H6'), 7.10-7.14 (m, 1H, H4'), 3.36 (q, 2H, J = 6.7 Hz, NCH₂), 2.66 (t, 3H, J = 6.7 Hz, CH₂), 1.89-1.78 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 166.2, 153.8, 142.0, 141.8, 136.5, 129.1, 128.5, 128.5, 125.9, 32.7, 30.7, 30.5; MS (ESI, Pos.): m/z 257.06 (M+H)⁺.

4. HPLC lipophilicity determination

- capacity factor k and calculated log k

Agilent Technologies 1200 SL liquid chromatography with Diode-array Detector SL G1315C, chromatographic pre-column ZORBAX XDB-C18 5 μ m, 4 x 4 mm, Part No. 7995118-504 and column ZORBAX Eclipse XDB-C18 5 μ m, 4.6 x 250 mm, Part No. 7995118-585 (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA) were used. The separation process was controlled by Agilent ChemStation, version B.04.02 extended by

spectral module (Agilent Technologies Inc.). A solution of MeOH (HPLC grade, 70 %) with H₂O (HPLC-Milli-Q Grade, 30 %) was used as mobile phase. The total flow of the column was 1.0 mL/min, injection 20 µL, column temperature 30 °C. 210 nm as detection wavelength and 270 nm as monitor wavelength were chosen. The KI methanol solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) of synthesized compounds were measured in minutes. The capacity factors k were calculated using Microsoft Excel according to formula $k = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute and T_D denotes the dead time obtained via an unretained analyte. Log k , calculated from the capacity factor k , is used as the lipophilicity index converted to log P scale.

5. Lipophilicity calculation

Clog P (the logarithm of n -octanol/water partition coefficient P based on established chemical interactions) was calculated using the program CS ChemBioDraw Ultra version 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

6. Biological methods

6.1. *In vitro* antimycobacterial evaluation

Microplate alamar blue assay.¹ Antimycobacterial evaluation was shielded by Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic. Four mycobacterial strains were used: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). Tested compounds were dissolved in DMSO, diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) to final concentrations 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56 µg/mL and placed into microdilution panel. Tested species were added in the form of suspension in isotonic saline solution. The final concentration of DMSO was 0.5 % (v/v), this concentration of DMSO did not affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semisynthetic medium at pH 5.6 and 37 °C. 30 µL of working solution (1:1 mixture of 0.1% Resazurin sodium salt (aq. sol.) and 10% Tween 80) was used for visualization of growth. First of all, working solution was added to one positive growth control well and reincubated for 24 h. If the control turned pink, the Alamar Blue solution was added to all wells in the microplate. If none colour change is observed, the Alamar Blue solution would be added to another control well and the result would be read on following day. The working solution was usually added after 5 days of incubation for *M. avium*, after 5-7 days for *M. kansasii* and 10-14 days for *M. tuberculosis*. Results were then determined after 24 h and interpreted as follows: blue colour as no growth, pink colour as growth. Violet colour was interpreted as growth according to Framzblau *et al.*¹ The minimal inhibition concentration (MIC, µg/mL) was determined as the lowest concentration which prevented a colour change from blue to pink.

6.2. *In vitro* antibacterial evaluation

Microdilution broth method.² The organisms examined included strains from Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. These strains are recommended as standards for testing of antibacterial activities. Other strains were clinical isolates (Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* H 5996/08-methicilin resistant (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL positive. All strains were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C and maintained on the same medium at 4 °C. Prior to testing, each strain was passaged onto MHA. Bacterial inocula were prepared by suspending in sterile 0.85% saline. The cell density of the inoculum was adjusted to yield suspension of density equivalent 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 viable CFU/mL). The compounds were dissolved in DMSO, and the antibacterial activity was determined in Mueller-Hinton liquid broth (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. Controls consisted of medium and DMSO alone. The final concentration of DMSO in the test medium did not exceed 1% (v/v) of the total solution composition. The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as 95% inhibition of bacterial growth as compared to control, was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C

Table 1. Antibacterial activity of 6-hexylaminopyrazine-2-carboxamide (**2g**) and standards. Data expressed as minimal inhibitory concentration (MIC) in $\mu\text{mol/L}$, strain: *Staphylococcus epidermidis* H 69/08 (**SE**).

Strain		MIC ($\mu\text{mol/L}$)				
		Neomycin	Bacitracin	Pencillin G	Ciprofloxacin	2g
SE	24 h	7.81	15.62	125	250	62.5
	48 h	15.62	31.25	250	250	125

6.3. *In vitro* antifungal evaluation

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic, performed the antifungal susceptibility assays, which was carried out using microdilution broth method. (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Method for Antifungal Disc Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline M44-A; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2004.) Compounds were dissolved in DMSO and diluted in a twofold manner with RPMI 1640 medium with glutamine buffered to pH 7.0 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid). The final concentration of DMSO in the tested medium did not exceed 2.5 % (v/v) of the total solution composition. Static incubation was performed in the dark and humid, at 35 °C for 24 and 48 h (respectively 72 and 120 h for *Trichophyton mentagrophytes*). Drug-free controls were included. Fluconazole was used as standard. Tested species: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/1, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigates* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445.

6.4. Cytotoxicity measurement^{3,4}

Cell line: The human hepatocellular liver carcinoma cell line Hep G2 (passages 26 - 31) purchased from Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK) was routinely cultured in MEM (Minimum Essentials Eagle Medium) (SIGMA ALDRICH) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA), 1% L-Glutamine solution (SIGMA ALDRICH) and non-essential amino acid solution (SIGMA ALDRICH) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. For subculturing, the cells were harvested after trypsin/EDTA (SIGMA ALDRICH) treatment at 37 °C. The cells treated with the tested substances were used as experimental groups. Untreated HepG2 cells were used as control groups. The cells were seeded in density 1×10^4 cells per well in a 96-well plate. Next day, the cells were treated with each of the tested substances dissolved in DMSO. The most of the tested substances were prepared at different incubation concentrations in triplicates. 5-Cl-PZA was tested in concentration range 10 – 2000 µM, 6-Cl-PZA at 500 – 4000 µM and the rest of the compounds at 0.1 – 500 µM. The controls: 100 % cell viability, 0 % cell viability (the cells treated by 10% DMSO). Cell control and vehiculum controls were also prepared in triplicates. After 24 h incubation in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37 °C, the reagent from the kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (CellTiter 96; PROMEGA) was added. After other 1.5 h incubation at 37 °C, the absorbance was recorded at 490 nm. A standard toxicological parameter IC₅₀ was calculated by nonlinear regression using GraphPad Prism software (version 6).

7. Docking procedure

The 3D coordinates of the studied compounds were obtained by CORINA 3D structure generator online service and downloaded in PDB format. The structures were transformed into AutoDock ligands using AutoDock Tools 1.5.6. (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute); all rotatable bonds were marked as rotatable for docking. The receptor (pdb: 3PL1) was prepared using a standard protocol incorporated in Maestro 9.3.5 (Schrödinger, Inc.), so called Protein Preparation Wizard with default settings. All water molecules were removed, except for HOH220 and HOH221, which are coordinated to Fe²⁺ ion and have significant *H*-bond interactions to aminoacyl residues of the protein. Moreover, HOH220 is known to bind to nitrogen atom of pyrazine nucleus of pyrazinamide. The prepared receptor structure was converted to Autodock format (PDBQT) using Autodock Tools 1.5.6.

The docking calculation was performed by AutoDock Vina 1.1.2⁵ using Lamarckian genetic algorithm. The grid box for the first run covered the whole binding cavity, repeated precision runs were performed with the grid box adjusted to the coordinates of the docked ligands. The precision runs were performed with increased exhaustiveness parameter (exhaustiveness = 12).

The visualizations and interaction diagrams were prepared by Maestro (Schrodinger, Inc.).

Results and discussion

1. Docking study

The docking results of pyrazinamide (PZA) into the substrate binding cavity of mycobacterial pyrazinamidase (PncA, pdb: 3PL1) were evaluated with respect to the catalytic mechanism proposed by Petrella *et al.*⁶ In our docking calculations, the ligand pose with the highest affinity (-5.3 kcal/mol by AutoDock Vina scoring function) did not correspond to the expected substrate position. However, the second best pose with only a little lower affinity (-5.1 kcal/mol) showed all the important ligand-protein interactions described in the literature.⁶ As seen in Fig. 1, in this binding mode the carboxamido function establishes *H*-bonds to Ile133 and Ala134, and the N4 nitrogen atom of the pyrazine nucleus has an *H*-bond to HOH220. This water molecule itself is coordinated to the Fe²⁺ ion and has an *H*-bond to Ala102. Importantly, the carboxamido group is oriented towards the catalytic triad (Cys198, Asp8, Lys96) and is within reach of Cys138, which was proposed to attack the carboxamido carbon atom to form the acyl-enzyme complex. Based on the facts described above, this binding pose of PZA (Fig. 1) was considered the most favourable for the catalytic hydrolysis and the poses of docked alkylaminopyrazine-2-carboxamides (**1h**, **1i**, **2h** and **2i**) were compared to this reference pose of PZA.

As seen from Fig. 1, the substituents on C5 and C6 of the pyrazine nucleus would protrude towards the end of the cavity formed by Trp68. The distance between the PZA ring and the Trp68 plane is approx. 4–5 Å, which is little space to accommodate any larger substituent. Therefore, we expected that the 5-alkylamino and 6-alkylaminopyrazine-2-carboxamides with longer alkyl chains would have to be displaced from the position needed for the catalytic transformation.

Indeed, the docking results of compounds **1h**, **1i**, **2h** and **2i** (*i.e.* octylamino and heptylamino derivatives, the most active compounds from the presented series) confirm our expectation. Fig. 2 presents the best docking poses of the alkylamino derivatives to the receptor with preserved water HOH220, Fig. 3 to the receptor without HOH220 (displacement of water). In both cases, it is obvious that the carboxamido groups of alkylamino derivatives are directed significantly away from the catalytic triad. The place occupied by the pyrazine nucleus of PZA is occupied with alkyl chains of alkylamino derivatives. Based on the results, we conclude that neither 5-alkylamino nor 6-alkylamino derivatives of PZA will be converted to respective carboxylic acids by the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*.

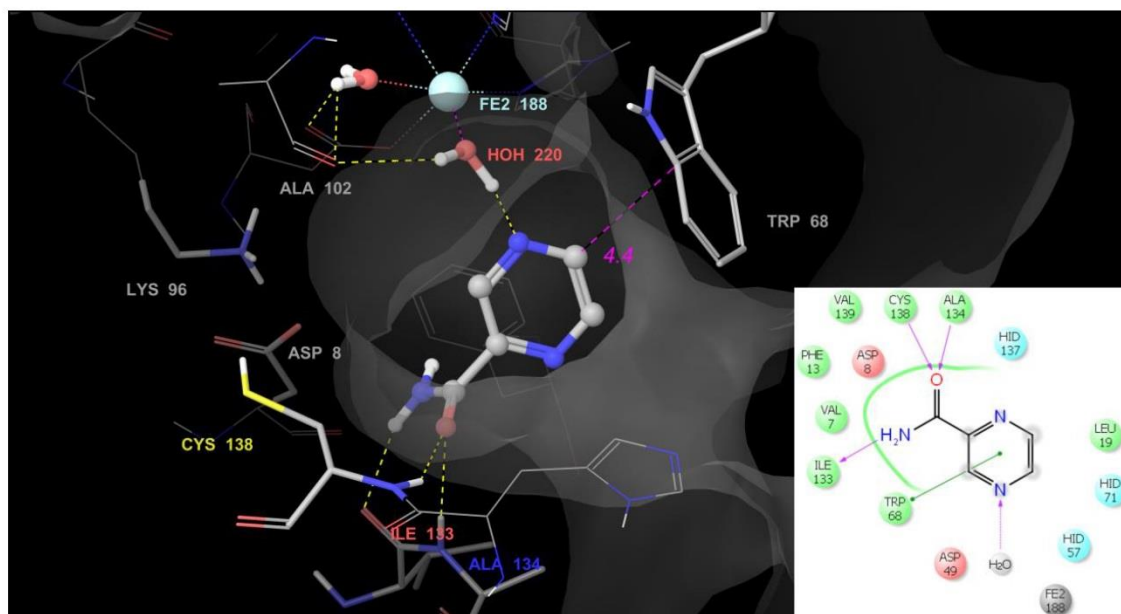


Fig. 1. The reference binding pose of PZA in mycobacterial pyrazinamidase (PncA; pdb: 3PL1), affinity = -5.1 kcal/mol. Interaction diagram shows the ligand-protein interactions.

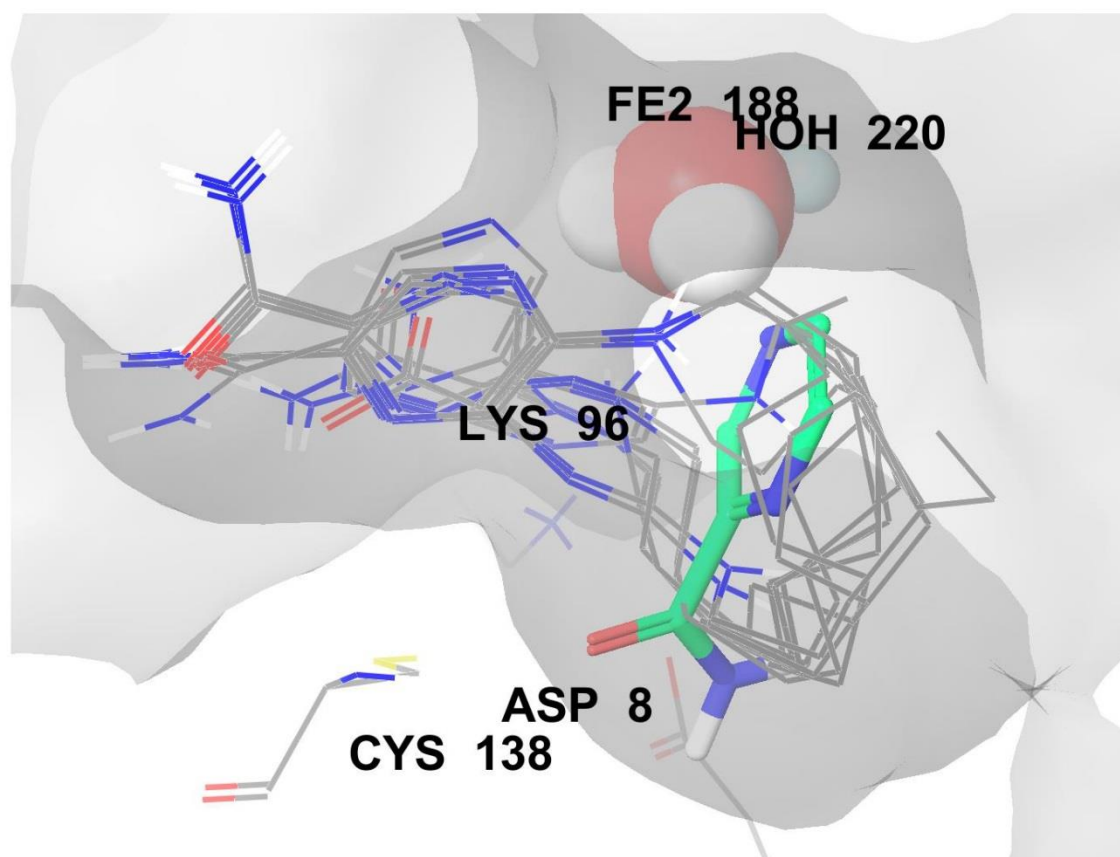


Fig. 2. Predicted poses of compounds **1h**, **1i**, **2h** and **2i** (wires) in the cavity of PncA in comparison with the reference binding pose of PZA (sticks). The catalytic site is represented by Cys138, Asp8 and Lys96. The docking calculation included water HOH220.

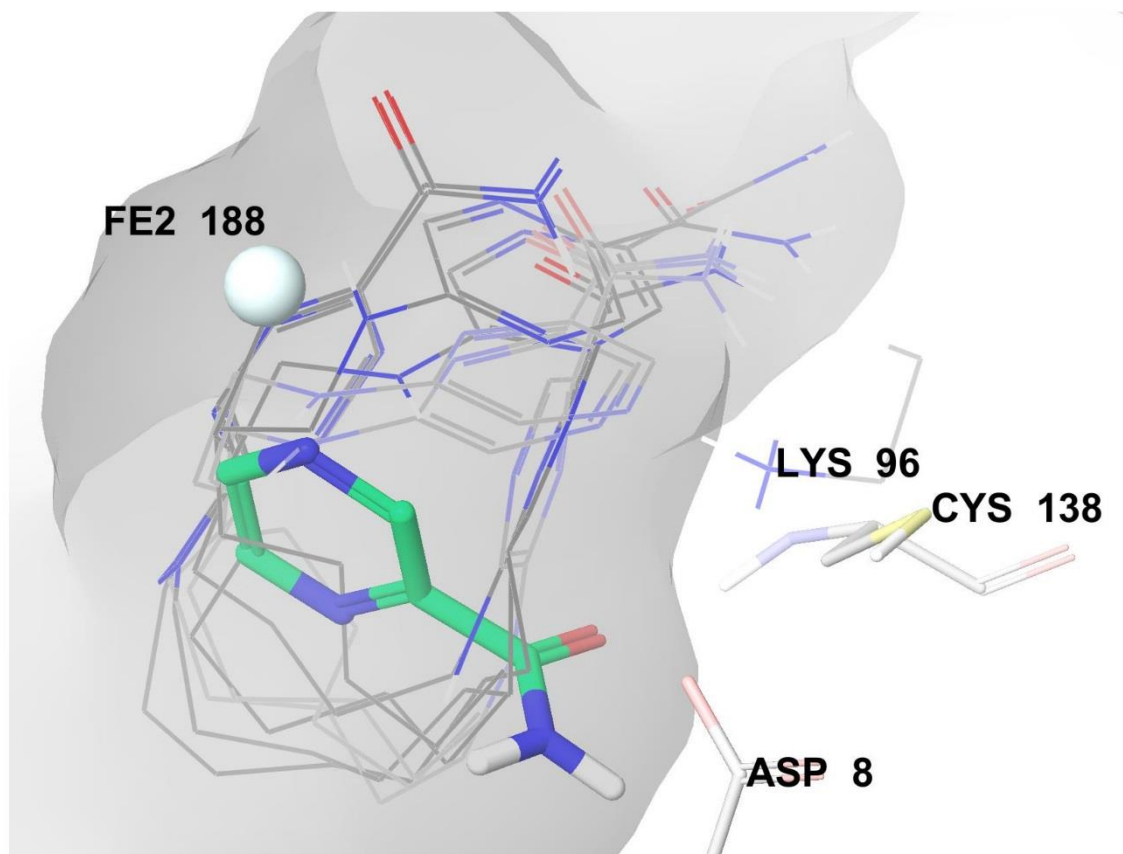


Fig. 3. Predicted poses of compounds **1h**, **1i**, **2h** and **2i** (wires) in the cavity of PncA in comparison with the reference binding pose of PZA (sticks). The catalytic site is represented by Cys138, Asp8 and Lys96. The docking calculation excluded water 11011220.

References:

1. Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M.T.; Cook, M.B.; Quenzer, V.K.; Ferguson, R.M.; Gilman, R.H. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362.
2. Jones, R.N.; Barry, A.L. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 1920.
3. Promega Corporation. CellTiter 96® Aqueous one solution cell proliferation assay. Owen, T.C. U.S. Patent, 5185,450, 1993.
4. Kratky, M.; Vinsova, J.; Volkova, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolarikova, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 433.
5. Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.
6. Petrella, S.; Gelus-Ziental, N.; Maudry, A.; Laurans, C.; Boudjelloul, R.; Sougakoff, W. *Plos One* **2011**, *6* (1), e15785. doi:10.1371/journal.pone.0015785.

PŘÍLOHA P5

SERVUSOVA-VANASKOVA, B., P. PATEROVA, V. GARAJ, J. MANDIKOVA, J. KUNEŠ, L. NAESENS, P. JÍLEK, M. DOLEŽAL, J. ZITKO. Synthesis and antimicrobial evaluation of 6-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chemical Biology & Drug Design*, **2015**, 86(4), 674-681. [ISSN 1747-0285]. IF₂₀₁₃ = 2.507.

Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 6-Alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides

Barbora Servusova-Vanaskova^{1,*}, Pavla Paterova^{1,2}, Vladimir Garaj³, Jana Mandikova¹, Jiri Kunes¹, Lieve Naesens⁴, Petr Jilek¹, Martin Dolezal¹ and Jan Zitko^{1,*}

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

²Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

³Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, Bratislava 832 32, Slovakia

⁴Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven 3000, Belgium

*Corresponding authors: Barbora Servusova, barbora.servusova@faf.cuni.cz; Jan Zitko, jan.zitko@faf.cuni.cz

This work presents synthesis and antimicrobial evaluation of nineteen 6-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. Antimycobacterial activity was determined against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. kansasii* and two strains of *M. avium*. Generally, the antimycobacterial activity increased with prolongation of simple alkyl chain and culminated in compounds with heptylamino substitution (3e, 4e) with MIC = 5–10 μM against *M. tuberculosis* H37Rv. On the contrary, derivatives with modified alkyl chain (containing e.g. terminal methoxy or hydroxy group) as well as phenylalkylamino derivatives were mainly inactive. The most active compounds (with hexyl to octylamino substitution) were evaluated for their *in vitro* activity against drug-resistant strains of *M. tuberculosis* and possessed activity comparable to that of the reference drug isoniazid. None of the tested compounds were active against *M. avium*. Some derivatives exhibited activity against Gram-positive bacteria including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (best MIC = 7.8 μM), while Gram-negative strains as well as tested fungal strains were completely unsusceptible. Active compounds were tested for *in vitro* toxicity on various cell lines and in most cases were non-toxic up to 100 μM .

Key words: antibacterial evaluation, antimycobacterial evaluation, cytotoxicity, multidrug-resistant strains, pyrazinamide derivatives

Abbreviations: CRFK, Crandell feline kidney cells; FAS I, fatty acid synthase I; HEL, Human embryonic lung fibroblasts;

HeLa, Human cervix epithelial cells; HepG2, Human hepatocellular carcinoma cells; INH, isoniazid; MDR, multidrug-resistant; MIC, minimal inhibitory concentration; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; *Mtb*, *Mycobacterium tuberculosis*; Nam, nicotinamide; PncA, pyrazinamidase/nicotinamidase; POA, pyrazinoic acid; PZA, pyrazinamide; RpsA, ribosomal protein S1; SA, *Staphylococcus aureus*; SE, *Staphylococcus epidermidis*; TB, tuberculosis; Vero, African green monkey kidney cells; XDR, extensively drug-resistant.

Received 1 December 2014, revised 13 January 2015 and accepted for publication 23 January 2015

Tuberculosis (TB) is one of the most lethal and frequent infection diseases worldwide. In 2013, an estimated 9.0 million people fell ill with TB (64% were newly diagnosed cases) and 1.5 million died from TB (1). Resistant TB forms, namely multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) TB, as well as the increasing number of patients co-infected with HIV (1,2) (1.1 million of all TB cases in 2013) (1) constitute a serious problem and emphasize the need for novel antitubercular drugs. Pyrazinamide (PZA) is one of the most important first-line drugs used in TB therapy (3). Apart from sterilizing activity (synergistic effect with rifampicin) (4), PZA has multiple mechanisms of action. It acts directly as an active compound or is a prodrug. As a prodrug, PZA is metabolized via pyrazinamidase (EC 3.5.1.19) to pyrazinoic acid (POA) (5,6). Recently, the specific targets for PZA and/or POA were recognized (7–12). Both PZA and POA inhibit mycobacterial fatty acid synthase I (FAS I) (13), an enzyme that participates in the synthesis of mycolic acids which are essential components of the mycobacterial cell wall (7–11). In 2011, ribosomal protein S1 (RpsA), a vital protein involved in protein translation and the ribosome-sparing process of trans-translation, was identified as a specific target for POA (12). During the last decade, variety of substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides was designed, prepared and intensively screened for antimycobacterial activity (14–18). As a complementary test, most of these compounds were also screened for *in vitro* antibacterial and antifungal activity. A substantial number of tested *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides selectively inhibited the growth of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. With some exceptions, no significant antibacterial and antifungal activity was observed. Based on the results of

mentioned studies, two anilides (**1** and **2**) derived from 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid were prepared and screened for antimycobacterial, antibacterial and antifungal activity. Unfortunately, no significant activity was observed. Following recently published studies, in which the positive influence of long alkyl chain (C6–C8) on antimycobacterial activity was observed (19–21), our attention was refocused on alkylamino derivatives of PZA. 6-Chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**1**) and 6-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**) served as initial leads for compounds mentioned in this study. The anilide part of the compound was preserved, while 6-chlorine was substituted by alkylamines in the range from propylamine to octylamine to yield final compounds (**3a–f**, **4a–f**). Methylamine and ethylamine were omitted due to negligible activity of methylamino and ethylamino pyrazine derivatives in previously published series (19–21). Based on the first results of antimycobacterial screening and to study the influence of a simple alkyl chain on activity, series of phenylalkylamino, hydroxyalkylamino and methoxyalkylamino derivatives were prepared and evaluated (marked as **3g–m**). MycPermCheck (22) is an online tool used for the prediction of permeability of small molecules (MW < 500 Daltons) through *Mycobacterium tuberculosis* cell wall. The prediction is based on a logistic regression model of selected physico-chemical molecular descriptors of compounds which were active in whole-cell *in vitro* assays (and are therefore considered to be permeable). MycPermCheck was used to predict the permeability of studied compounds and to compare obtained data with whole-cell *in vitro* antimycobacterial activity. Most of the authors agree that PZA acts as a prodrug that needs to be converted by the mycobacterial enzyme pyrazinamidase/nicotinamidase PncA (EC 3.5.1.19) (6,12). However, PZA and some of its simple derivatives, for example 5-chloropyrazinamide, were shown to act in non-hydrolysed carboxamide form as competitive inhibitors of mycobacterial fatty acid synthase I (10,11,23). A molecular docking study was therefore performed to predict whether the active compounds of the presented series could be substrates of PncA to be converted into their hydrolysed acidic form.

Methods and Materials

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Höhenkirchen, Germany). All organic solvents used for the

synthesis were of analytical grade. Detailed synthetic procedures and analytical data of presented compounds are available in the Supporting Information. Biological methods were described in full details in previous publications (18,21) and can be found in the Supporting Information as well.

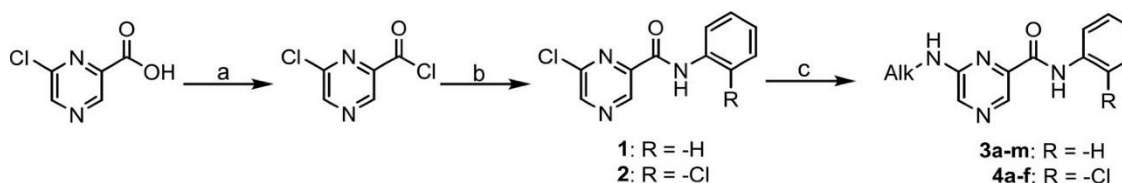
Results and Discussion

Chemistry

As shown in Scheme 1, 6-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**1**) and 6-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**) were prepared by convenient two-step synthesis using 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (**24**), which was treated with thionyl chloride to form 6-chloropyrazine-2-carbonyl chloride. Aniline or 2-chloroaniline was used for aminolysis of carbonyl chloride to form corresponding compounds **1** or **2** (purified by flash column chromatography). Final structures **3a–f** and **4a–f** were prepared by means of nucleophilic substitution of chlorine by non-aromatic amines (for the structures, please see Table 1). Analytical data of all prepared compounds were in accordance with proposed structures. IR spectrum of all compounds (**1**, **2**, **3a–m** and **4a–f**) had carbonyl (C=O) transmittance peak in the range of 1667–1685 cm⁻¹. ¹H NMR spectra exhibited amidic hydrogen (-CONH-) as a broad singlet (independently of the solvent) in the range of 10.45–9.57 ppm. Shift of hydrogen of amino group was significantly dependent on the solvent used for measurement. For compounds measured in DMSO-*d*₆ (**3b–m**), hydrogen of -NH- group was observed as triplet in the range of 7.56–7.44 ppm. For the compounds measured in CDCl₃ (**3a**, **4a–f**), broad singlet in the range of 5.13–4.98 ppm was observed. ¹³C NMR spectra of all compounds exhibited carbonyl carbon (-CONH-) in the range of 162.82–159.51 ppm and carbons of simple aliphatic chain (**3a–f**, **4a–f**) in the range of 43.28–11.48 ppm.

In vitro antimycobacterial activity

All prepared compounds were evaluated for antimycobacterial activity against four mycobacterial strains. Results were expressed as minimal inhibitory concentration (MIC) in µg/mL or in µM with respect to the molecular weight. Table 1 provides an overview of the antimycobacterial activity against the strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb*). Both tested strains of *Mycobacterium avium*



Scheme 1: Synthesis of starting compounds **1** and **2** and subsequent synthesis of final compounds **3a–m** and **4a–f**. Reagents and conditions: (a) SOCl₂, toluene, reflux, 1.5 h; (b) aniline/2-chloroaniline, acetone, TEA, RT, 2 h; (c) non-aromatic amines, TEA, EtOH, reflux, 8 h.

**Table 1:** Summary of prepared compounds, their properties and whole-cell *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb*)

No.	R	Alk	log <i>P</i>	MIC		Perm ^a
				<i>Mtb</i> (μg/mL)	<i>Mtb</i> (μM)	
3a	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇	1.63	12.5	49	0.438
3b	H	<i>n</i> -C ₄ H ₉	2.04	6.25	23	0.541
3c	H	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	2.46	3.13	11	0.640
3d	H	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	2.88	1.56	5	0.727
3e	H	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	3.29	1.56	5	0.798
3f	H	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	3.71	3.13	10	0.853
3g	H	-(CH ₂) ₂ Ph	2.81	>100	>313	0.998
3h	H	-(CH ₂) ₃ Ph	3.23	100	301	0.999
3i	H	-(CH ₂) ₃ OH	0.39	100	367	0.074
3j	H	-(CH ₂) ₄ OH	0.84	100	349	0.095
3k	H	-(CH ₂) ₅ OH	1.26	50	167	0.164
3l	H	-(CH ₂) ₂ OCH ₃	0.65	100	367	0.089
3m	H	-(CH ₂) ₃ OCH ₃	0.75	50	175	0.123
4a	Cl	<i>n</i> -C ₃ H ₇	2.18	25	86	0.634
4b	Cl	<i>n</i> -C ₄ H ₉	2.60	25	82	0.692
4c	Cl	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	3.02	6.25	20	0.773
4d	Cl	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃	3.44	6.25	19	0.782
4e	Cl	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	3.85	3.13	9	0.884
4f	Cl	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇	4.27	6.25	17	0.898
1	H	–	1.49	25	107	0.891
2	Cl	–	2.05	100	373	0.874
PZA ^b			–1.31	12.5	102	–
INH ^c			–0.64	0.2–1.56	2–11	–

^aPerm. = probability of permeation through mycobacterial cell wall calculated by MycPermCheck; a value of 1000 equals 100%.

^bPZA pyrazinamide.

^cINH isoniazid.

were completely resistant to prepared compounds (MIC >100 μg/mL). Except for compounds **3f** and **4d** (MIC = 6.25 μg/mL), no significant activity was observed against *Mycobacterium kansasii* (MIC > 100 μg/mL). Starting compounds 6-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**1**, MIC = 107 μM) and 6-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**, MIC = 373 μM) exhibited only poor antimycobacterial activity against *Mtb* and were also completely inactive against other tested mycobacterial strains. Substitution of chlorine by simple aliphatic alkylamine led to an appreciable increase in activity for an extended range of amines (from propylamine to octylamine, MIC = 5–86 μM). Compounds with non-substituted phenyl derived from **1** displayed slightly better activities than corresponding 2-chlorophenyl derivatives synthesized from **2**. Taking into account the molecular weight (MIC values converted to molar concentration in μM), most active compounds (**3d–f** and **4e**, MIC = 5–10 μM) exhibited similar activity as the therapeutically used standard isoniazid (**INH**, MIC = 2–11 μM), yet markedly higher activity than the other reference drug pyrazinamide (**PZA**, MIC = 102 μM) and both starting anilides **1** and **2** as well. Attempted structural changes in simple aliphatic chain led

to decrease or complete loss of activity. The insertion of an aromatic nucleus into the aliphatic chain resulted in completely inactive compounds (**3g**, **3h**). The activity of derivatives substituted with aminoalcohols (**3i–k**) or methoxyalkylamines (**3l**, **3m**) was negligible (MIC = 167–367 μM).

The probability value calculated by MycPermCheck (22) serves to express the probability of a compound to penetrate through the mycobacterial cell wall. Compounds with a probability value over 0.82 are ranked as permeable, while compounds with probability value under 0.55 are predicted to be impermeable (22).

The ability to penetrate the mycobacterial cell wall is an important criterion for activity, but obviously it is not the only condition that must be met by a drug candidate. In this study, starting compounds **1** and **2** as well as **3g** and **3h** are hypothetically permeable (probability value over 0.82) but have no significant activity. Incorporation of a terminal hydroxyl or methoxy group into the aliphatic chain drastically reduced the predicted permeability and led to inactive compounds (**3i–m**). Prolongation of alkyl



chain increased the probability of permeation, for example in series **3** going from theoretically impermeable propylamino derivative **3a**, through pentylamino (**3c**) and heptylamino (**3e**) derivatives with moderate permeation, to octylamino derivative **3f** with good permeability. Generally, the MycPermCheck prediction tool supports our previously formulated hypothesis (21) that a long alkylamino chain is a structural factor that facilitates permeation of the mycobacterial cell wall. Among other determinants, permeability is closely associated with lipophilicity. We therefore compared the $\log P$ of the compounds with their antimycobacterial activity. A significant dependence between the length of the alkyl chain (lipophilicity) and antimycobacterial activity was observed for compounds with a simple aliphatic chain (**3a–f**, **4a–f**, likewise in previously published series) (19–21). The highest activity ($\text{MIC} < 10 \mu\text{M}$) was observed for compounds with a $\log P$ value in the range of 2.5–4.0 (corresponding to compounds with hexyl- to octylamino substitution), while inactive compounds ($\text{MIC} > 100 \mu\text{M}$) usually had $\log P$ value lower than 1.5 (see Graph 1).

The negligible activity of hydroxyalkylamino derivatives (**3i–k**) and methoxyalkylamino derivatives (**3l**, **3m**) demonstrates that modification of long alkyl chain with polar groups is not desirable. As seen in Graph 1, the activity of phenylalkylamino derivatives (**3g**, **3h**) was trifling compared to simple alkylamino derivatives. This decrease of activity could be caused by steric effect of phenyl core. Selected active compounds were also evaluated for their activity against seven drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* with different resistance patterns (clinical isolates; Table 2). All tested compounds exhibited moderate activity, which was in general lower than the activity of INH. However, compound **3f** showed promising activity

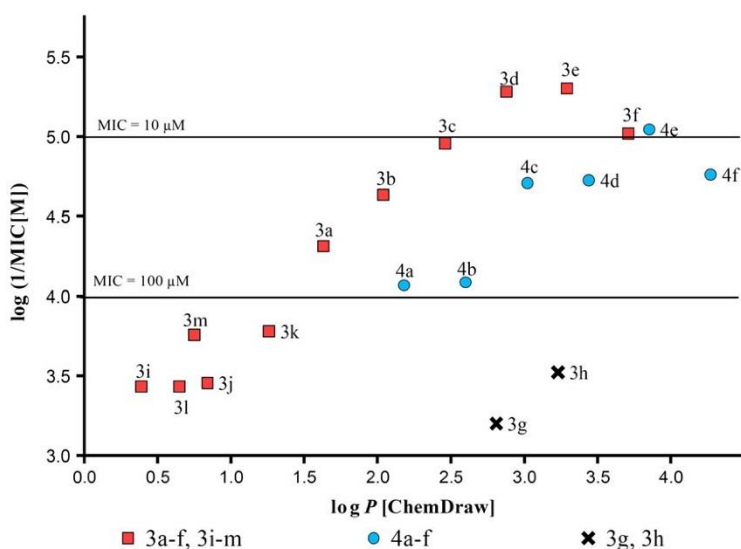
against all tested strains with MIC values comparable to those of INH.

In vitro antibacterial and antifungal activity

To complete the biological study, all prepared compounds including starting compounds were screened for activity against eight bacterial and eight fungal strains. Compounds **3b–e** and **4d** exhibited activity against Gram-positive strains *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis* (Table 3), while Gram-negative strains were completely resistant to these compounds. The other prepared compounds (including starting compounds **1** and **2**) did not affect the growth of Gram-positive strains. Compound **3b** showed only moderate antibacterial activity ($125\text{--}250 \mu\text{M}$). More importantly, compounds **3c–e** exhibited relatively potent antibacterial activity ($\text{MIC} = 7.81\text{--}62.5 \mu\text{M}$) against methicillin-resistant *S. aureus*. Also activity against *S. epidermidis* was in a similar range ($\text{MIC} = 7.81\text{--}31.3 \mu\text{M}$) for compounds **3c–e** and **4d**. These activities were fully comparable or even superior to the activity of reference compounds. Gram-negative strains as well as all fungal strains were completely resistant against all prepared compounds (including the starting compounds **1** and **2**) even at the highest concentrations used in the assay ($\text{MIC} > 500 \mu\text{M}$).

Cytotoxicity

In vitro cytotoxicity (25–27) assays were performed for compounds with heptylamino (**3e**, **4e**) and octylamino substitution (**3f**, **4f**). The results were expressed as the compound concentration causing minimal changes in cell morphology (MCC) or as 50% cytotoxic concentration (CC_{50} , compound reducing cell viability by 50%, as



Graph 1: Dependence of antimycobacterial activity on lipophilicity $\log P$.

**Table 2:** Antimycobacterial activity of selected derivatives against MDR-TB and XDR-TB strains, minimal inhibitory concentrations in μM

No.	R	Alk	MIC (μM)													
			<i>Mtb.</i> 234/2005		<i>Mtb.</i> 9449/2007		<i>Mtb.</i> 7357/1998		<i>Mtb.</i> 8666/2010		<i>Mtb.</i> Praha 1		<i>Mtb.</i> Praha 4		<i>Mtb.</i> Praha131	
			14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d	14d	21d
3d	-H	- <i>n</i> -C ₆ H ₁₃	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
3e	-H	- <i>n</i> -C ₇ H ₁₅	32	32	16	32	16	32	16	32	32	32	16	32	16	32
3f	-H	- <i>n</i> -C ₈ H ₁₇	16	16	16	32	16	32	16	16	16	16	16	32	16	16
4d	-Cl	- <i>n</i> -C ₆ H ₁₃	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
4e	-Cl	- <i>n</i> -C ₇ H ₁₅	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
4f	-Cl	- <i>n</i> -C ₈ H ₁₇	32	62.5	32	62.5	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	32	62.5	32	62.5
INH			16	16	16	16	16	32	16	32	16	16	16	16	16	16

MDR-TB strains: **234/2005** and **7357/1998** both resistant to INH, RIF, rifabutine, streptomycin, ethambutol and ofloxacin; **Praha 1** resistant to INH, RIF, rifabutine, streptomycin, ethambutol and clofazimine; **8666/2010** resistant to INH, RIF, rifabutine; **9449/2006** and **Praha 4** both resistant to INH, RIF, rifabutine, ethambutol and streptomycin. XDR-TB strain: **Praha 131** resistant to INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol, ofloxacin, gentamicin and amikacin.

Table 3: Antibacterial activity of the most active derivatives, MIC values defined as 95% inhibition of bacterial growth read after 24 and 48 h

No.	MIC (μM)					
	SA		MRSA		SE	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
3b	125	125	250	250	250	250
3c	31.3	125	31.3	31.3	15.6	31.3
3d	250	>500	7.81	62.5	7.81	31.3
3e	250	>500	7.81	15.6	7.81	31.3
4d	>500	>500	>500	>500	31.3	31.3
Neomycin	1.95	3.9	3.9	7.81	15.6	15.6
Bacitracin	7.81	7.81	7.81	31.3	15.6	31.3
Penicillin G	0.49	0.98	62.5	125	125	250

SA, *Staphylococcus aureus*; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*; SE, *S. epidermidis*.

assessed by a colorimetric formazan assay). As shown in Table 4, all tested compounds were not cytotoxic at a concentration of 100 μM .

In addition, for compound **3f**, an *in vitro* hepatotoxicity assay was carried out in human HepG2 hepatoma cells. The decrease in viability of the HepG2 cells was measured using a colorimetric assay based on the reduction of tetrazolium (28,29) and results expressed as IC₅₀ (concentration causing 50% inhibition of cell proliferation). Based on these HepG2 model, 6-octylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**3f**) appears to have moderate cytotoxicity (IC₅₀ = 30.7 μM).

Docking

We performed a molecular docking study to estimate whether the active compounds of the presented series

Table 4: Cytotoxic effect of selected compounds on different cell lines expressed as CC₅₀^a, MCC^a or IC₅₀ in μM

No.	CRFK ^b	HEL ^c	HeLa ^d	Vero ^e	HepG2 ^f
	CC ₅₀ μM	MCC μM	MCC μM	MCC μM	IC ₅₀ μM
3e	>100	>100	>100	>100	ND
3f	>100	>100	>100	>100	30.7
4e	>100	>100	>100	>100	ND
4f	>100	>100	>100	>100	ND

ND, not done.

^aCytotoxicity is expressed as the minimum cytotoxic concentration (MCC; compound concentration producing minimal changes in cell morphology, as estimated by microscopy), or the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀; estimated by the MTS cell viability assay). Value preceded by the sign '>' means that at the indicated concentration, no significant cytotoxicity was observed.

^bCrandell Rees feline kidney cells.

^cHuman embryonic lung fibroblasts.

^dHuman cervix epithelial cells.

^eAfrican green monkey kidney cells.

^fHuman hepatocellular liver carcinoma cell line.

can be substrates of PncA and could be hydrolysed to their acidic form. Initially, we tried to apply a simple docking procedure described in our previous publication (21), in which the probability of conversion was determined simply based on the orientation of the carboxamido group of studied PZA derivatives at the active site of enzyme PncA (pdb: 3PL1). In that study, the carboxamide moiety of docked 5-alkylamino and 6-alkylaminopyrazine-2-carboxamides was directed significantly away from the catalytic site of the enzyme, preventing the catalytic reaction. Using this described procedure, we docked compounds **3a-f** but found that the results were unclear. Because of sterically demanding substituents at both ends of the molecule (i.e. alkylamino and phenyl substituent), some conformations of the docked compounds had their carboxamide moiety relatively close and quite well oriented towards the

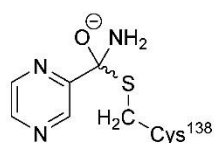


Figure 1: General structure of the proposed substrate-enzyme tetrahedral intermediate.

catalytic triad of the enzyme, which is compatible with the possibility for hydrolytic cleavage of the compounds. However, docking of small molecules into the active site of an enzyme by itself is not sufficient to distinguish between enzyme inhibitors and substrates (30). Enzymatic hydrolysis of a carboxamide by PncA proceeds through the formation of the acyl-enzyme covalent complex, originating from the nucleophilic attack on the carboxamide carbon by the reactive thiol group of Cys138 (31). We hypothesize that this acyl-enzyme complex is preceded by a tetrahedral intermediate (Figure 1), analogous to the catalytic mechanism described for the related nicotinamidase from *Acinetobacter baumannii* (32).

Formation of the tetrahedral intermediate and its stabilization by interaction with active site residues are crucial for substrate conversion. We thus used a covalent docking protocol embedded in Schrödinger Suite to simulate the formation of the ligand-enzyme tetrahedral intermediates. The intermediates were simulated for compounds **3a** (short alkyl chain, moderate activity) and **3e** (long alkyl chain, high activity), and compared with intermediates constructed from known substrates of PncA, that is nicotinamide (Nam) and pyrazinamide (PZA). The covalent docking protocol produced highly stabilized tetrahedral ligand-protein intermediates for both known substrates Nam and PZA. These Nam and PZA intermediates shared the same interaction pattern. Namely, their carbonyl oxygen (oxoanion) forms *H*-bonds to the backbone NH groups of Cys138 and Ala134. The ligand's $-NH_2$ group forms an *H*-bond interaction to the side chain carboxyl of Asp8. The ring nitrogen in *meta* position to the carboxamide forms an *H*-bond to water 220, which itself is coordinated to a Fe^{2+} ion. Furthermore, the heteroaromatic nucleus is stabilized by π - π stacking interaction (T-shaped) with the planar ring of Trp68. Figure 2 represents Nam covalently bound to PncA and the interactions that stabilize its tetrahedral intermediate. The PZA-derived intermediate showed the same interactions, and the superposition of PZA and Nam intermediates is presented in Figure 3. To sum up, the covalent docking protocol that we used was able to predict ligand-enzyme tetrahedral intermediates with all important stabilizing interactions described in a published Petrella *et al.* (31). model of acyl-enzyme complex for PZA and PncA. In this model, water 202 is positioned under the carbonyl carbon to prepare for final hydrolysis of the acyl-enzyme complex. Therefore, we first tried to perform the covalent docking with HOH202

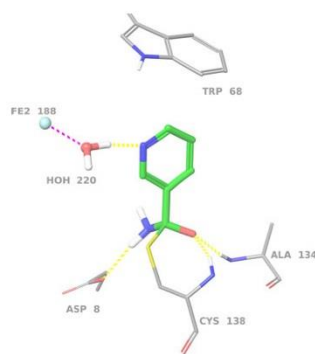


Figure 2: Stabilization of Nam-PncA tetrahedral intermediate.

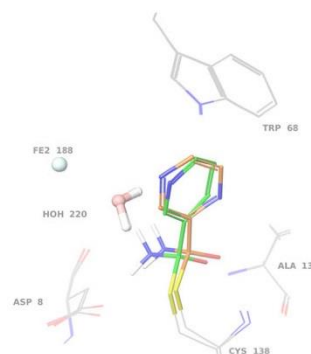


Figure 3: Superposition of PZA-PncA (orange carbons) and Nam-PncA (green carbons) intermediates.

(together with Fe^{2+} co-ordinated HOH220 and HOH221), but we did not obtain tetrahedral intermediates with the desired orientation. Omitting the hydrolysing water 202 from the protein before covalent docking led to the intermediates described above, in which the space formerly occupied by HOH202 is reserved for the $-NH_2$ group of PZA or Nam. This can be interpreted as temporarily displacement of water 202 which returns to its hydrolysing position when the tetrahedral intermediate proceeds to the planar acyl-enzyme complex (i.e. the C-N bond breaks and the $-NH_2$ group is leaving).

Following the same procedure, we produced the tetrahedral intermediates for compounds **3a** and **3e**. These intermediates were not stabilized by any of the interactions describe above. Figure 4 shows the superposition of the intermediate form **3e** and Nam. The differences in the spatial arrangement and orientation of individual groups attached to the tetrahedral carbon explain the inability of the **3e** intermediate to form stabilizing interactions, either between its oxoanion and Cys138 and Ala134, or its $-NH$ to the side chain carboxyl of Asp8. Due to the lack of stabilization of their tetrahedral intermediates, we conclude that compounds **3a** and **3e** are unlikely to be substrates for mycobacterial pyrazinamidase PncA.

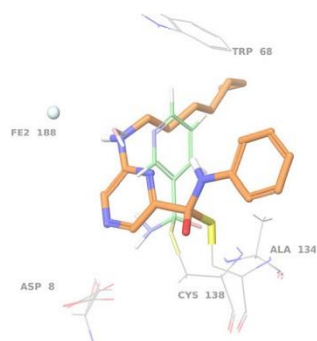


Figure 4: Superposition of PZA-PncA (orange carbons) and Nam-PncA (green carbons) intermediates.

Conclusions

The main aim of this project was to increase the antimycobacterial activity of two newly prepared anilides (**1** and **2**) with negligible activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Two series of alkylamino derivatives (**3a–f**, **4a–f**) were designed, synthesized and screened for biological activities. All compounds with simple aliphatic chain exerted higher antimycobacterial activity than the corresponding starting compound **1** or **2**. Generally, the antimycobacterial activity increased with lipophilicity (corresponds to the length of alkyl chain) and culminated in compounds with heptylamino substitution (**3e**, **4e**). The most active compounds (with hexyl to octylamino substitution, marked from **d** to **f**) were also screened for activity against seven drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. All these compounds showed activity comparable to that of the reference drug isoniazid (INH). Except for compounds **3f** and **4d** (MIC = 6.25 µg/mL, *M. kansasii*, comparable with INH), no activity was observed against tested strains of *Mycobacterium kansasii* and *M. avium*. To study the influence of a simple aliphatic chain on antimycobacterial activity, part of the chain was replaced with phenyl ring (**3g**, **3h**), hydroxyl group (**3i–k**) or methoxy group (**3l** and **3m**). These substitutions led to significant decrease or complete loss of activity. The results of cytotoxicity assays suggest that the tested compounds are non-toxic at the highest concentration tested (100 µM). Compound **3f** displayed moderate cytotoxicity (IC₅₀ = 30.7 µM) in human hepatoma cells. A covalent docking procedure was used to predict potential hydrolysis of compounds **3a** and **3e** by PncA enzyme, to yield the corresponding carboxylic acid forms. On the basis of the lack of stabilization of the tetrahedral intermediates, we conclude that compounds **3a** and **3e** probably do not undergo hydrolysis by PncA and, thus, appear to act in their non-hydrolysed form.

Acknowledgments

The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic Project No.

Antimycobacterial 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazinamides

CZ.1.07/2.3.00/20.0235, the title of the project: TEAB; and by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic Project No. CZ.1.07/2.3.00/30.0022. This study was also supported by the Ministry of Health of Czech Republic (IGA NZ 13346), Grant Agency of Charles University B-CH/710312 and SVV 260062. This work was supported by grant VEGA 1/0039/12. The computations were performed on HPC resources at the Toxicological and Antidoping Center (TAC) of Faculty of Pharmacy UK in Bratislava. The authors also wish to thank Ida Dufková for performing and evaluating the antifungal and antibacterial assays, and Leentje Persoons for performing cytotoxicity assays.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08.
2. Goletti D., Weissman D., Jackson R.W., Graham N.M., Vlahov D., Klein R.S., Munsiff S.S., LOrtona L., Cauda R., Fauci A.S. (1996) Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol*;157:1271–1278.
3. Lima C.H.S., Bispo M.L.F., de Souza M.V.N. (2011) Pirazinamida: um fármaco essencial no tratamento da tuberculose. *Rev Virtual Quim*;3:159–180.
4. Zhang Y., Mitchison D. (2003) The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tubercul Lung Dis*;7:6–21.
5. Konno K., Feldmann F.M., McDermott W. (1967) Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis*;95:461–469.
6. Zhang Y., Wade M.M., Scorpio A., Zhang H., Sun Z. (2003) Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*;52:790–795.
7. Zimhony O., Cox J.S., Welch J.T. (2000) Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FAS I) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med*;6:1043–1047.
8. Boshoff H.I., Mizrahi V., Barry C.E. (2002) Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol*;184:2167–2172.
9. Zimhony O., Vilchev C., Arai M., Welch J.T., Jacobs W.R. (2007) Pyrazinoic acid and its *n*-propyl ester inhibit fatty acid synthase I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrob Agents Chemother*;51:752–754.
10. Ngo S., Zimhony O., Chung W.J., Sayahi H., Jacobs W.R., Welch J.T. (2007) Inhibition of isolated mycobacterium tuberculosis fatty acid synthase I by pyrazinamide analogs. *Antimicrob Agents Chemother*;51:2430–2435.



11. Sayahi H., Zimhony O., Jacobs W.R., Shekhtman A., Welch J.T. (2011) Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg Med Chem Lett*;21:4804–4807.
12. Shi W., Zhang W., Jiang X., Yuan H., Lee J.S., Barry C.E., Wang H.H., Zhang W.H., Zhang Y. (2011) Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*;333:630–1632.
13. Brennan P.J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*;83:91–97.
14. Doležal M., Turová L., Kešetovičová D., Tuma J., Král'ová K. (2007) Substituted *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides, their synthesis and evaluation as herbicides and abiotic elicitors. *Molecules*;12:2589–2598.
15. Doležal M., Cmedlova P., Palek L., Vinsova J., Kunes J., Buchta V., Jampilek J., Kralova K. (2008) Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *Eur J Med Chem*;43:1105–1113.
16. Doležal M., Zitko J., Osicka Z., Kunes J., Vejsova M., Buchta V., Dohnal J., Jampilek J., Kralova K. (2010) Synthesis, antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity of chlorinated *N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*;15:8567–8581.
17. Doležal M., Kesetovic D., Zitko J. (2011) Antimycobacterial evaluation of pyrazinoic acid reversible derivatives. *Curr Pharm Des*;17:3506–3514.
18. Zitko J., Servusová B., Paterová P., Mandíková J., Kubíček V., Kučera R., Hrabcová V., Kuneš J., Soukup O., Doležal M. (2013) Synthesis, antimycobacterial activity and *in vitro* cytotoxicity of 5-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Molecules*;18:14807–14825.
19. Zitko J., Doležal M., Svobodová M., Vejsová M., Kuneš J., Kučera R., Jílek P. (2011) Synthesis and antimycobacterial properties of *N*-substituted 6-amino-5-cyanopyrazine-2-carboxamides. *Bioorg Med Chem*;19:1471–1476.
20. Zitko J., Jampilek J., Dobrovolný L., Svobodová M., Kuneš J., Doležal M. (2012) Synthesis and antimycobacterial evaluation of *N*-substituted 3-aminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Bioorg Med Chem Lett*;22:1598–1601.
21. Servusová B., Paterová P., Mandíková J., Kubíček V., Kučera R., Kuneš J., Doležal M., Zitko J. (2014) Alkylamino derivatives of pyrazinamide: synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*;24:450–453.
22. Merget B., Zilian D., Müller T., Sotriffer Ch.A. (2013) MycPermCheck: the *Mycobacterium tuberculosis* permeability prediction tool for small molecules. *Bioinformatics*;29:62–68.
23. Sayahi H., Pugliese K.M., Zimhony O., Jacobs W.R., Shekhtman A., Welch J.T. (2012) Analogs of the anti-tuberculous agent pyrazinamide are competitive inhibitors of NADPH binding to *M. tuberculosis* fatty acid synthase I. *Chem Biodivers*;9:2582–2596.
24. Abe Y., Shigeta Y., Uchimarui F., Okada S., Ozasayma E. Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. JP Patent 44012898, 1969; Chem. Abstr. 1969, 71, 112979y.
25. Naesens L., Stephens C.E., Andrei G., Loregian A., De Bolle L., Snoeck R., Sowell J.W., De Clercq E. (2006) Antiviral properties of new arylsulfone derivatives with activity against human betaherpesviruses. *Antiviral Res*;72:60–67.
26. Naesens L., Vanderlinden E., Roth E., Jeko J., Andrei G., Snoeck R., Pannecouque C., Illyes E., Batta G., Herczegh P., Sztaricskai F. (2009) Anti-influenza virus activity and structure-activity relationship of aglycoristocetin derivatives with cyclobutenedione carrying hydrophobic chains. *Antiviral Res*;82:89–94.
27. Vanderlinden E., Göktas F., Cesur Z., Froeyen M., Reed M.L., Russell C.J., Cesur N., Naesens L. (2010) Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin. *J Virol*;84:4277–4288.
28. Promega Corporation. CellTiter 96[®] Aqueous one solution cell proliferation assay. Owen, T.C. U.S. Patent, 5185, 450, 1993.
29. Kratky M., Vinsova J., Volkova M., Buchta V., Trejtnar F., Stolarikova J. (2012) Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur J Med Chem*;50:433–440.
30. Juhl P.B., Trodler P., Tyagi S., Pleiss J. (2009) Modeling substrate specificity and enantioselectivity for lipases and esterases by substrate-imprinted docking. *BMC Struct Biol*;9:39–55.
31. Petrella S., Gelus-Ziental N., Maudry A., Laurans C., Boudjelloul R., Sougakoff W. (2011) Crystal structure of the pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS ONE*;6:e15785.
32. Fyfe P.K., Rao V.A., Zemla A., Cameron S., Hunter W.N. (2009) Specificity and mechanism of *Acinetobacter baumannii* nicotinamidase: implications for activation of the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *Angew Chem Int Ed*;48:9176–9179.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1. Experimental Section.

Supporting information

Synthesis and antimicrobial evaluation of 6-alkylamino-*N*-phenyl-pyrazine-2-carboxamides

Barbora Servusova-Vanaskova^{*[a]}, Pavla Paterova^[a,b], Vladimir Garaj^[c], Jana Mandikova^[a], Jiri Kunes^[a], Lieve Naesens^[d], Petr Jílek^[a], Martin Dolezal^[a] and Jan Zitko^{*[a]}

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

^b Department of Clinical Microbiology, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

^c Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, Bratislava, 832 32, Slovakia

^d Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven, 3000, Belgium

*Corresponding authors:

Barbora Servusova, barbora.servusova@faf.cuni.cz

Jan Zitko, jan.zitko@faf.cuni.cz

Experimental Section

General

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Höhenkirchen, Germany). All organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. The reactions were monitored using Merck Silica 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were purified using automated chromatograph CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany); gradient elution (hexane/ethyl-acetate), detection wavelength 260 nm, monitor wavelength 280 nm. NMR analysis was performed on Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C or on Varian Mercury-Vx BB 500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). IR spectra were measured in ATR mode using a Ge crystal-plate on Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA). LRMS: Mass spectra were recorded in the mixture of MeOH, H₂O, formic acid (80:20:0.02 v/v) using LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The electrospray ionisation was performed in the positive mode. Melting points were determined on Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected. Log *P* was calculated using the program CS ChemBioDraw Ultra version 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Yields refer to chromatographically pure products after all purification operations. Elemental analysis was performed on CE Instruments EA-1110 CHN analyser (CE Instruments, Wigan, United Kingdom). All values are given as percentages.

General synthetic procedures

Synthesis of starting compounds 1 and 2

For the synthesis of starting compounds **1** and **2**, 20 mmol of 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid (MW = 158.54 g/mol) was dissolved in anhydrous toluene, treated with thionyl chloride (3 eq., 60 mmol) and heated for about 1.5 h under reflux. Then, the excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with anhydrous toluene *in vacuo*. The crude acyl chloride was dissolved in anhydrous acetone.

Second step of the synthesis was carried out under mild conditions: 1.5 eq. of corresponding aniline or 2-chloroaniline was dissolved in anhydrous acetone with TEA (1 eq.) and added dropwise to the stirred solution of acyl chloride. The reaction mixture was stirred at room temperature for about 2 h and monitored using TLC with hexane/ethyl acetate 2:1 mixture as eluent. After this time small amount of silica was added and solvents were evaporated under reduced pressure. Adsorbed mixture was addressed to flash column chromatography. Yields were approximately 80 %.

Synthesis of final compounds 3a-m and 4a-f

To synthesize final compounds, 1 mmol of 6-chloro-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamide (**1**) or 6-chloro-*N*-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (**2**) was dissolved in ethanol with triethylamine (1 eq., 1 mmol). Five equivalents of corresponding non-aromatic amine were added to the reaction mixture and refluxed in small amount

of ethanol generally for 8 hours. The completion of the reaction was checked by TLC chromatography (eluent: hexane/ethyl acetate, 1:1). The crude product was absorbed on silica by solvent evaporation and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate gradient elution). To remove residual non-aromatic amine, final compounds were recrystallized from ethanol.

Analytical data of prepared compounds

6-chloro-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (1).

White solid. Yield 83%; mp 102.4-103.1 °C. IR (cm⁻¹) 3317, 1675, 1598, 1584, 1548, 1520. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.05 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.81 – 7.73 (m, 2H, ArH), 7.41 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.18 – 7.08 (m, 1H, ArH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.52, 153.71, 141.57, 138.11, 137.09, 129.27, 128.94, 124.30, 120.47; MS (ESI, Pos.): m/z 234.04 (M+H)⁺; MW 233.65. Anal. Calcd. for C₁₁H₈ClN₃O: C, 56.55; H, 3.45; N, 17.98. Found: C, 56.50; H, 3.47; N, 17.99.

N-phenyl-6-propylaminopyrazine-2-carboxamide (3a).

White solid; yield = 61%; mp 131.1-132.7 °C. IR (cm⁻¹) 3347, 3270, 1685, 1600, 1549, 1520, 1498. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.57 (bs, 1H, NH), 8.67 (s, 1H, 3H), 8.08 (s, 1H, 5H), 7.74 – 7.67 (m, 2H, ArH), 7.44 – 7.32 (m, 2H, ArH), 7.19 – 7.10 (m, 1H, ArH), 5.07 (bs, 1H, NH), 3.47 – 3.34 (m, 2H, CH₂), 1.81 – 1.63 (m, 2H, CH₂), 1.05 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.61, 152.69, 141.23, 137.40, 135.32, 131.33, 129.06, 124.47, 119.66, 43.28, 22.46, 11.56; MS (ESI, Pos.): m/z 257.16 (M+H)⁺; MW = 256.30. Anal. Calcd. for C₁₄H₁₆N₄O: C, 65.61; H, 6.29; N, 21.86. Found: C, 65.68; H, 6.24; N, 21.83.

6-butylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3b).

White solid; yield = 34%; mp 90.3-90.9 °C. IR (cm⁻¹) 3362, 3311, 1675, 1594, 1557, 1542, 1509. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.05 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.81 – 7.73 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.41 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.18 – 7.08 (m, 1H, ArH), 3.50 – 3.39 (m, 2H, CH₂), 1.63 – 1.49 (m, 2H, CH₂), 1.43 – 1.38 (m, 2H, CH₂), 0.93 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.55, 153.71, 141.62, 138.12, 137.09, 129.26, 128.94, 124.30, 120.47, 39.85, 30.99, 19.93, 13.99; MS (ESI, Pos.): m/z 271.19 (M+H)⁺; MW = 270.33. Anal. Calcd. for C₁₅H₁₈N₄O: C, 66.64; H, 6.71; N, 20.73. Found: C, 66.72; H, 6.69; N, 20.77.

6-pentylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3c).

White solid; yield = 38%; mp 77.8-78.1 °C. IR (cm⁻¹) 3312, 3301, 1667, 1597, 1564, 1541, 1519. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.04 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.80 – 7.73 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 5.4 Hz, 1H, NH), 7.40 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.13 – 7.09 (m, 1H, ArH), 3.47 – 3.39 (m, 2H, CH₂), 1.63 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.41 – 1.31 (m, 4H, CH₂), 0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.82, 153.98, 141.89, 138.40, 137.37, 129.54, 129.21, 124.57, 120.73, 40.42, 29.26, 28.82, 22.41, 14.43; MS (ESI, Pos.): m/z 285.20 (M+H)⁺; MW = 284.36. Anal. Calcd. for C₁₆H₂₀N₄O: C, 67.58; H, 7.09; N, 19.70. Found: C, 67.51; H, 7.13; N 19.68.

6-hexylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3d).

White solid; yield = 42%; mp 58.6-59.3 °C. IR (cm⁻¹) 3327, 3281, 1683, 1596, 1585, 1548, 1522. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.04 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.80 – 7.74 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.40 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.16 – 7.08 (m, 1H, ArH), 3.48 – 3.38 (m, 2H, CH₂), 1.61 – 1.52 (m, 2H, CH₂), 1.42 – 1.34 (m, 2H, CH₂), 1.34 – 1.23 (m, 4H, CH₂), 0.85 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.51, 153.68, 141.57, 138.10, 137.08, 129.23, 128.90, 124.27, 120.42, 40.15, 31.26, 28.82, 26.43, 22.30, 14.08; MS (ESI, Pos.): m/z 299.22 (M+H)⁺; MW = 298.38. Anal. Calcd. for C₁₇H₂₂N₄O: C, 68.43; H, 7.43; N, 18.78. Found: C, 68.46; H, 7.50; N, 18.70.

6-heptylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3e).

White solid; yield = 56%; mp 61.9-62.8 °C. IR (cm⁻¹) 3337, 3271, 1671, 1598, 1545, 1519, 1501. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.03 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.81 – 7.74 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.39 – 7.32 (m, 2H, ArH), 7.16 – 7.09 (m, 1H, ArH), 3.47 – 3.40 (m, 2H, CH₂), 1.59 – 1.56 (m, 2H, CH₂), 1.41 – 1.29 (m, 4H, CH₂), 1.28 – 1.20 (m, 4H, CH₂), 0.82 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.50, 153.67, 141.56, 138.09, 137.07, 129.22, 128.89, 124.26, 120.41, 40.15, 31.47, 28.86, 28.69, 26.72, 22.22, 14.10; MS (ESI, Pos.): m/z 313.22 (M+H)⁺; MW = 312.41. Anal. Calcd. for C₁₈H₂₄N₄O: C, 69.20; H, 7.74; N, 17.93. Found: C, 69.15; H, 7.76; N, 17.97.

6-octylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3f).

White solid; yield = 48%; mp 67.7-68.7 °C. IR (cm⁻¹) 3359, 3315, 1675, 1595, 1557, 1544, 1513. ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.04 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.82 – 7.72 (m, 2H, ArH), 7.44 (t, J = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.40 – 7.31 (m, 2H, ArH), 7.17 – 7.06 (m, 1H, ArH), 3.48 – 3.37 (m, 2H, CH₂), 1.64 – 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.44 –

1.14 (m, 10H, CH₂), 0.81 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.49, 153.68, 141.55, 138.10, 137.07, 129.21, 128.89, 124.25, 120.40, 40.11, 31.42, 28.98, 28.91, 28.87, 26.74, 22.26, 14.09; MS (ESI, Pos.): *m/z* 327.24 (M+H)⁺; MW = 326.44. Anal. Calcd. for C₁₉H₂₆N₄O: C, 69.91; H, 8.03; N, 17.16. Found: C, 69.87; H, 7.99; N, 17.21.

6-phenethylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3g).

White solid; yield = 31%; mp 143.2-144.1 °C. IR (cm⁻¹) 3410, 3325, 1676, 1591, 1563, 1547, 1523. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.05 (bs, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 3H), 8.13 (s, 1H, 5H), 7.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, ArH), 7.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.41 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.33 – 7.30 (m, 2H, ArH), 7.29 – 7.24 (m, 2H, ArH), 7.21 – 7.11 (m, 2H, ArH), 3.76 – 3.66 (m, 2H, CH₂), 2.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.48, 153.50, 141.58, 139.81, 138.12, 137.12, 129.48, 128.98, 128.92, 128.40, 126.22, 124.27, 120.44, 41.71, 35.03; MS (ESI, Pos.): *m/z* 319.19 (M+H)⁺; MW = 318.38. Anal. Calcd. for C₁₉H₁₈N₄O: C, 71.68; H, 5.70; N, 17.60. Found: C, 71.75; H, 5.67; N, 17.55.

N-phenyl-6-(3-phenylpropylamino)pyrazine-2-carboxamide (3h).

White solid; yield = 28%; mp 82.7-83.8 °C. IR (cm⁻¹) 3395, 3340, 1675, 1587, 1565, 1535, 1511. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.00 (bs, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 3H), 8.14 (s, 1H, 5H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.53 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.41 – 7.34 (m, 2H, ArH), 7.29 – 7.21 (m, 4H, ArH), 7.18 – 7.12 (m, 2H, ArH), 3.51 – 3.43 (m, 2H, CH₂), 2.71 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.94 – 1.85 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.47, 153.65, 141.96, 141.56, 138.06, 137.07, 129.35, 128.92, 128.46, 128.45, 125.90, 124.30, 120.45, 40.13, 32.86, 30.68; MS (ESI, Pos.): *m/z* 333.25 (M+H)⁺; MW = 332.41. Anal. Calcd. for C₂₀H₂₀N₄O: C, 72.27; H, 6.06; N, 16.86. Found: C, 72.83; H, 6.10; N, 16.79.

6-(3-hydroxypropylamino)-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3i).

White solid; yield = 74%; mp 138.8-139.6 °C. IR (cm⁻¹) 3401, 3340, 3298, 1678, 1587, 1552, 1537, 1503. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.20 (bs, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.82 – 7.75 (m, 2H, ArH), 7.49 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.39 – 7.34 (m, 2H, ArH), 7.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 4.66 (bs, 1H, OH), 3.57 – 3.47 (m, 4H, CH₂), 2.51 – 2.47 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.50, 153.74, 141.47, 138.20, 137.00, 129.23, 128.93, 124.22, 120.30, 58.61, 37.10, 32.58; MS (ESI, Pos.): *m/z* 273.12 (M+H)⁺; MW = 272.31. Anal. Calcd. for C₁₄H₁₆N₄O₂: C, 61.75; H, 5.92; N, 20.58. Found: C, 61.68; H, 5.95; N, 20.61.

6-(4-hydroxybutylamino)-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3j).

White solid; yield = 49%; mp 106.1-107.3 °C. IR (cm⁻¹) 3394, 3325, 3299, 1675, 1596, 1561, 1549, 1511. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.04 (bs, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, ArH), 7.46 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.39 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 4.43 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, OH), 3.48 – 3.42 (m, 4H, CH₂), 1.66 – 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.58 – 1.50 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.51, 153.69, 141.56, 138.10, 137.09, 129.26, 128.91, 124.27, 120.49, 60.66, 40.11, 30.19, 25.49; MS (ESI, Pos.): *m/z* 287.16 (M+H)⁺; MW = 283.33. Anal. Calcd. for C₁₅H₁₈N₄O₂: C, 62.92; H, 6.34; N, 19.57. Found: C, 62.98; H, 6.36; N, 19.48.

6-(5-hydroxypentylamino)-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3k).

White solid; yield = 36%; mp 109.4-110.1 °C. IR (cm⁻¹) 3380, 3379, 3334, 3271, 1676, 1591, 1576, 1555, 1519. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.04 (bs, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, ArH), 7.44 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.39 – 7.34 (m, 2H, ArH), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 4.36 (bs, 1H, OH), 3.52 – 3.37 (m, 4H, CH₂), 1.63 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.52 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.44 – 1.38 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.52, 153.68, 141.59, 138.10, 129.24, 128.91, 124.27, 120.46, 60.82, 40.23, 32.48, 28.75, 23.36; MS (ESI, Pos.): *m/z* 301.07 (M+H)⁺; MW = 300.36. Anal. Calcd. for C₁₆H₂₀N₄O₂: C, 63.98; H, 6.71; N, 18.65. Found: C, 63.90; H, 6.74; N, 18.67.

6-(2-methoxyethylamino)-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3l).

White solid; yield = 90%; mp 92.3-92.9 °C. IR (cm⁻¹) 3387, 3356, 3280, 1675, 1594, 1571, 1549, 1511. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.09 (bs, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, 3H), 8.19 (s, 1H, 5H), 7.78 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, ArH), 7.52 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.41 – 7.33 (m, 2H, ArH), 7.15 – 7.11 (m, 1H, ArH), 3.71 – 3.60 (m, 2H, CH₂), 3.58 – 3.50 (m, 2H, CH₂), 3.30 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.53, 153.60, 141.53, 138.14, 137.25, 129.57, 128.86, 124.29, 120.65, 70.80, 58.15, 39.92; MS (ESI, Pos.): *m/z* 273.11 (M+H)⁺; MW = 272.31. Anal. Calcd. for C₁₄H₁₆N₄O₂: C, 61.75; H, 5.92; N, 20.58. Found: C, 61.73; H, 5.88; N, 20.60.

6-(3-methoxypropylamino)-N-phenylpyrazine-2-carboxamide (3m).

White solid; yield = 42%; mp 84.5-85.1 °C. IR (cm⁻¹) 3405, 3380, 3310, 1676, 1587, 1570, 1561, 1525. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.06 (bs, 1H, NH), 8.28 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.77 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, ArH), 7.49 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, NH), 7.42 – 7.31 (m, 2H, ArH), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, ArH), 3.51 – 3.46 (m, 2H, CH₂), 3.46 – 3.41 (m, 2H, CH₂), 3.24 (s, 3H, CH₃), 1.85 – 1.78 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.46, 153.64, 141.52, 138.09,

137.10, 129.35, 128.95, 124.31, 120.41, 69.86, 58.10, 37.37, 28.97; MS (ESI, Pos.): m/z 287.17 (M+H)⁺; MW = 286.33. Anal. Calcd. for C₁₅H₁₈N₄O₂: C, 62.92; H, 6.34; N, 19.57. Found: C, 62.87; H, 6.42; N, 19.59.

6-chloro-N-(2-chlorophenyl)pyrazine-2-carboxamide (2).

White solid; yield = 78%; mp 96.5-97.3 °C. IR (cm⁻¹) 3322, 1670, 1593, 1584, 1540, 1517. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.12 (bs, 1H, NH), 9.39 (s, 1H, 3H), 8.84 (s, 1H, 5H), 8.57 (d, J = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.50 – 7.47 (m, 1H, ArH), 7.41 – 7.35 (m, 1H, ArH), 7.16 – 7.12 (m, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 159.51, 147.79, 147.65, 143.88, 142.14, 133.85, 129.34, 127.86, 125.51, 123.77, 121.38. MS (ESI, Pos.): m/z 268.51 (M+H)⁺; MW = 268.10. Anal. Calcd. for C₁₁H₇Cl₂N₃O: C, 49.28; H, 2.63; N, 15.67. Found: C, 49.30; H, 2.67; N, 15.61.

N-(2-chlorophenyl)-6-propylaminopyrazine-2-carboxamide (4a).

White solid; yield = 71%; mp 126.1-126.7 °C. IR (cm⁻¹) 3349, 3270, 1679, 1593, 1584, 1551, 1517. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.45 (bs, 1H), 8.67 – 8.65 (m, 1H, ArH), 8.64 (s, 1H, 3H), 8.10 (s, 1H, 5H), 7.44 – 7.37 (m, 1H, ArH), 7.37 – 7.28 (m, 1H, ArH), 7.12 – 6.98 (m, 1H, ArH), 5.11 (bs, 1H, NH), 3.50 – 3.38 (m, 2H, CH₂), 1.81 – 1.64 (m, 2H, CH₂), 1.02 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.74, 152.71, 141.15, 136.19, 134.52, 130.98, 129.10, 127.87, 124.62, 122.98, 120.74, 43.13, 22.41, 11.48; MS (ESI, Pos.): m/z 291.20 (M+H)⁺; MW = 290.75. Anal. Calcd. for C₁₄H₁₅ClN₄O: C, 57.83; H, 5.20; N, 19.27. Found: C, 57.77; H, 5.26; N, 19.29.

N-(2-chlorophenyl)-6-butylaminopyrazine-2-carboxamide (4b).

White solid; yield = 82%; mp 117.3-118.2 °C. IR (cm⁻¹) 3345, 3299, 1677, 1592, 1585, 1547, 1517. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.45 (bs, 1H, NH), 8.69 – 8.62 (m, 1H, ArH), 8.59 (s, 1H, 3H), 8.07 (s, 1H, 5H), 7.46 – 7.38 (m, 1H, ArH), 7.37 – 7.27 (m, 1H, ArH), 7.10 – 7.00 (m, 1H, ArH), 5.00 (bs, 1H, NH), 3.53 – 3.42 (m, 2H, CH₂), 1.74 – 1.60 (m, 2H, CH₂), 1.45 (dp, J = 14.6, 7.3 Hz, 2H, CH₂), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.84, 152.61, 140.93, 136.44, 134.55, 131.35, 129.08, 127.84, 124.57, 122.97, 120.72, 41.08, 31.26, 20.20, 13.79; MS (ESI, Pos.): m/z 305.21 (M+H)⁺; MW = 307.77. Anal. Calcd. for C₁₅H₁₇ClN₄O: C, 59.11; H, 5.62; N, 18.38. Found: C, 59.07; H, 5.59; N, 18.43.

N-(2-chlorophenyl)-6-pentylaminopyrazine-2-carboxamide (4c).

White solid; yield = 57%; mp 109.3-110.1 °C. IR (cm⁻¹) 3351, 3306, 1681, 1592, 1584, 1544, 1515. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.44 (bs, 1H, NH), 8.69 – 8.63 (m, 1H, ArH), 8.60 (s, 1H, 3H), 8.11 (s, 1H, 5H), 7.47 – 7.38 (m, 1H, ArH), 7.37 – 7.28 (m, 1H, ArH), 7.14 – 7.01 (m, 1H, ArH), 5.09 (bs, 1H, NH), 3.53 – 3.41 (m, 2H, CH₂), 1.82 – 1.63 (m, 2H, CH₂), 1.49 – 1.29 (m, 4H, CH₂), 0.93 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.68, 152.71, 141.26, 136.03, 134.52, 130.80, 129.09, 127.87, 124.62, 122.98, 120.75, 41.41, 29.20, 28.90, 22.42, 14.01; MS (ESI, Pos.): m/z 319.25 (M+H)⁺; MW = 318.80. Anal. Calcd. for C₁₆H₁₉ClN₄O: C, 60.28; H, 6.01; N, 17.57. Found: C, 60.36; H, 5.97; N, 17.51.

N-(2-chlorophenyl)-6-hexylaminopyrazine-2-carboxamide (4d).

White solid; yield = 85%; mp 105.3-105.9 °C. IR (cm⁻¹) 3350, 3318, 1677, 1596, 1584, 1552, 1515. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.44 (bs, 1H, NH), 8.69-8.66 (m, 1H, ArH), 8.64 (s, 1H, 3H), 8.13 (s, 1H, 5H), 7.45 – 7.38 (m, 1H, ArH), 7.38 – 7.29 (m, 1H, ArH), 7.12 – 7.03 (m, 1H, ArH), 5.13 (bs, 1H, NH), 3.55 – 3.39 (m, 2H, CH₂), 1.77 – 1.61 (m, 2H, CH₂), 1.50 – 1.09 (m, 6H, CH₂), 0.98 – 0.75 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.63, 152.74, 141.36, 135.93, 134.51, 130.61, 129.09, 127.87, 124.63, 122.98, 120.74, 41.44, 31.53, 29.15, 26.74, 22.59, 14.00; MS (ESI, Pos.): m/z 333.25 (M+H)⁺; MW = 332.83. Anal. Calcd. for C₁₇H₂₁ClN₄O: C, 61.35; H, 6.36; N, 16.83. Found: C, 61.30; H, 6.43; N, 16.80.

N-(2-chlorophenyl)-6-heptylaminopyrazine-2-carboxamide (4e).

White solid; yield = 74%; mp 85.7-86.3 °C. IR (cm⁻¹) 3356, 3311, 1678, 1594, 1585, 1552, 1516. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.45 (bs, 1H, NH), 8.68 – 8.62 (m, 2H, ArH, 3H), 8.07 (s, 1H, 5H), 7.44 – 7.38 (m, 1H, ArH), 7.36 – 7.29 (m, 1H, ArH), 7.10 – 7.02 (m, 1H, ArH), 4.98 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH), 3.51 – 3.43 (m, 2H, CH₂), 1.76 – 1.63 (m, 2H, CH₂), 1.47 – 1.23 (m, 8H, CH₂), 0.90 – 0.86 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.84, 152.59, 140.93, 136.42, 134.55, 131.37, 129.08, 127.84, 124.56, 122.98, 120.72, 41.39, 31.76, 29.23, 29.01, 27.03, 22.56, 14.03; MS (ESI, Pos.): m/z 347.26 (M+H)⁺; MW = 346.85. Anal. Calcd. for C₁₈H₂₃ClN₄O: C, 62.33; H, 6.68; N, 16.15. Found: C, 62.27; H, 6.71; N, 16.11.

N-(2-chlorophenyl)-6-octylaminopyrazine-2-carboxamide (4f).

White solid; yield = 65%; mp 101.9-102.5 °C. IR (cm⁻¹) 3346, 3315, 1683, 1592, 1584, 1549, 1515. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.45 (bs, 1H, NH), 8.69-8.66 (m, 1H, ArH), 8.64 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.44-7.41 (m, 1H, ArH), 7.37 – 7.29 (m, 1H, ArH), 7.12 – 7.02 (m, 1H, ArH), 5.13 (bs, 1H, NH), 3.53 – 3.42 (m, 2H, CH₂), 1.76 – 1.62 (m, 2H, CH₂), 1.48 – 1.16 (m, 10H, CH₂), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.68, 152.72, 141.26, 136.04, 134.51, 130.74, 129.09, 127.85, 124.61, 122.99, 120.73, 41.42, 31.75, 29.30, 29.22, 29.19, 27.07, 22.60, 14.05; MS (ESI, Pos.): m/z 361.23 (M+H)⁺; MW = 360.88. Anal. Calcd. for C₁₉H₂₅ClN₄O: C, 63.24; H, 6.98; N, 15.53. Found: C, 63.28; H, 7.00; N, 15.49.

Biological methods

In vitro antimycobacterial evaluation

Microplate alamar blue assay.¹ Antimycobacterial evaluation was performed at the Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic. Four mycobacterial strains were used: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). Tested compounds were dissolved in DMSO, diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) to final concentrations of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56 µg/mL, than placed into a microdilution panel. The bacteria were added in the form of suspension in isotonic saline solution. The final concentration of DMSO [0.5 % (v/v)] was shown not to affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semisynthetic medium at pH 5.6 and 37 °C. 30 µL of working solution (1:1 mixture of 0.1% resazurin sodium salt (aq. sol.) and 10% Tween 80) was used for visualization of growth. The working solution was usually added after 5 days of incubation for *M. avium*, 5-7 days for *M. kansasii* and 10-14 days for *M. tuberculosis*. The results were then determined after 24 h and interpreted according to Framzblau *et al.*³³ The minimal inhibitory concentration (MIC, µg/mL) was determined as the lowest concentration which prevented a colour change from blue to pink.

Drug-resistant strains: clinically isolated *M. tuberculosis* 234/2005, *M. tuberculosis* 9449/2007, *M. tuberculosis* 7357/1998, *M. tuberculosis* 8666/2010, *M. tuberculosis* Praha 1, *M. tuberculosis* Praha 4 and *M. tuberculosis* Praha 131. Microplate dilution method. Tested compounds were dissolved in DMSO, diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) to final concentrations from 1 to 1000 µM. The reference agent INH was used in a sterile water solution within concentration range from 0.5 to 250 µM. Suspensions of the mycobacterial strains were adjusted to density of 1.0 on McFarland standard. The MIC was determined as the lowest concentration which inhibited the visual growth after incubation at 37 °C for 14/21 days.

In vitro antibacterial evaluation

Microdilution broth method.² The organisms examined included strains from the Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. These strains are recommended as standards for testing of antibacterial activities. Other strains were clinical isolates (Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* H 5996/08-methicillin resistant (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL positive. All strains were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C. Bacterial inocula were prepared by suspending in sterile 0.85% saline. The cell density of the inoculum was adjusted to yield a suspension of density equivalent to 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 viable CFU/mL). The compounds were dissolved in DMSO, and the antibacterial activity was determined in Mueller-Hinton liquid broth (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. Controls consisted of medium and DMSO alone. The final concentration of DMSO in the test medium did not exceed 1% (v/v). The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as 95% inhibition of bacterial growth as compared to control, was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C.

In vitro antifungal evaluation

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic, performed the antifungal susceptibility assays, which were carried out using the microdilution broth method. (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Method for Antifungal Disc Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline M44-A; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2004.) Compounds were dissolved in DMSO and twofold diluted in RPMI 1640 medium with glutamine buffered to pH 7.0 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid). The final concentration of DMSO in the tested medium did not exceed 2.5 % (v/v). Static incubation was performed in the dark and humid, at 35 °C for 24 and 48 h (respectively 72 and 120 h for *Trichophyton mentagrophytes*). Drug-free controls were included. Fluconazole was used as reference agent. Tested species: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* E28, *C. glabrata* 20/1, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Cytotoxicity assays

Toxicity in hepatoma cells.^{3,4} The human hepatocellular liver carcinoma cell line Hep G2 (passages 26-27) purchased from Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK) was routinely cultured in MEM (Minimum Essentials Eagle Medium) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA), 1% L-Glutamine solution (Sigma-Aldrich) and non-essential amino acid solution (Sigma-Aldrich) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. For subcultivation, the cells were harvested after trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) treatment at 37 °C. To perform the cytotoxicity assays, the cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 96-well plate. On the next day, the cells were treated with each of the test substances dissolved in DMSO and

diluted in medium. Each compound concentration or control (i.e. untreated cell control or vehiculum control) was performed in triplicate. Compound **3f** was tested at a concentration range 0 – 100 μM . The controls were: 100 % cell viability (untreated control) and 0 % cell viability (cells treated with 10% DMSO). After 24 h incubation in a humidified atmosphere containing 5 % CO_2 at 37 °C, the formazan reagent from the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega) was added. After another 1.5 h incubation at 37°C, the absorbance was recorded at 490 nm. The IC_{50} value was calculated by nonlinear regression using GraphPad Prism software (version 6).

Cytotoxicity was further determined on Crandell feline kidney (CrFK) cells, human embryonic lung (HEL) fibroblasts, human cervix epithelial (HeLa) cells and African green monkey kidney (Vero) cells. These assays were performed as described previously.⁵⁻⁷ The cytotoxicity was expressed as the minimum cytotoxic concentration (MCC; compound concentration producing minimal changes in cell morphology, as estimated by microscopy), or the 50% cytotoxic concentration (CC_{50} ; estimated by the MTS cell viability assay).

Docking procedure

All molecular modelling was done using Schrödinger Suite (Release 2014-2) and visualizations were prepared in Maestro 9.8 (Schrödinger, Inc.). Ligands were drawn manually in Maestro, converted to 3D and prepared as ligands using LigPrep (energy minimization using OPLS_2005 force field, generation of possible states at $\text{pH } 7.0 \pm 2.0$ using Epic, without generation of tautomers). The target protein was downloaded from the PDB databank (pdb: 3PL1) and prepared using Maestro Protein Preparation Wizard with default settings. Water molecules were removed with the exception of HOH220 and HOH221, which are coordinated to Fe^{2+} ion.

Covalent docking of the ligands was performed using automated built-in workflow, which requires selection of the ligand, protein, center and size of the grid box; designation of the reactive residue of the protein; and selection of the chemistry of the reaction to create the ligand-enzyme covalent bond. Cys138 was chosen as the reactive residue. From the predefined types of reactions, we chose Nucleophilic Addition to a Double Bond. The grid box was centered on the PZA ligand docked into the active site of PncA. The number of output poses for each ligand was set to five. All other parameters of covalent docking protocol were as default.

The addition of the cysteine thiol group to the amide C=O bond produced a tetrahedral complex of general formula $\text{R-C(OH)(NHR)(S-CH}_2\text{-)}$, i.e. the form with neutral hydroxyl –OH. The best pose of each covalently bound ligand was manually transformed to the oxoanion form $\text{R-C(O}^-\text{)(NHR)(S-CH}_2\text{-)}$ and the protein residues within radius of 5Å were minimized using OPLS_2005 force field and aqueous solvation model until RMS gradient was smaller than 0.01 kcal/mol/Å. These minimized tetrahedral complexes of individual ligands were used to evaluate the ligand-protein stabilising interactions.

References and notes

- Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M.T.; Cook, M.B.; Quenzer, V.K.; Ferguson, R.M.; Gilman, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362-366.
- Jones, R.N.; Barry, A.L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 1920-1925.
- Promega Corporation. CellTiter 96® AQueous one solution cell proliferation assay. Owen, T.C. U.S. Patent, 5185, 450, 1993.
- Kratky, M.; Vinsova, J.; Volkova, M.; Buchta, V.; Trejtnar, F.; Stolarikova, J. Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 433-440.
- Naesens, L.; Stephens, C.E.; Andrei, G.; Loregian, A.; De Bolle, L.; Snoeck, R.; Sowell, J.W.; De Clercq, E. Antiviral properties of new arylsulfone derivatives with activity against human betaherpesviruses. *Antiviral Res.* **2006**, *72*, 60-67.
- Naesens, L.; Vanderlinden, E.; Roth, E.; Jeko, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Pannecouque, C.; Illyes, E.; Batta, G.; Herczegh, P.; Sztaricskai, F. Anti-influenza virus activity and structure-activity relationship of aglycoristocetin derivatives with cyclobutenedione carrying hydrophobic chains. *Antiviral Res.* **2009**, *82*, 89-94.
- Vanderlinden, E.; Göktas, F.; Cesur, Z.; Froeyen, M.; Reed, M. L.; Russell, C. J.; Cesur, N.; Naesens, L. Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4277-4288.

PŘÍLOHA P6

SERVUSOVA-VANASKOVA, B., O. JANDOUREK, P. PATEROVA, J. KORDULAKOVA, M. PLEVAKOVA, V. KUBICEK, R. KUCERA, V. GARAJ, L. NAESENS, J. KUNES, M. DOLEZAL, J. ZITKO. Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *MedChemComm*, **2015**, 6(7), 1311-1317. [ISSN 2040-2503]. IF₂₀₁₃ = 2.626.



Cite this: *Med. Chem. Commun.*,
2015, 6, 1311

Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: synthesis and antimycobacterial evaluation†

Barbora Servusova-Vanaskova,^{*a} Ondrej Jandourek,^a Pavla Paterova,^a
Jana Kordulakova,^b Magdalena Plevakova,^a Vladimir Kubicek,^a Radim Kucera,^a
Vladimir Garaj,^c Lieve Naesens,^d Jiri Kunes,^a Martin Dolezal^a and Jan Zitko^{*a}

A series of alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide was designed, synthesized and assayed *in vitro* for their antimycobacterial, antibacterial, antifungal as well as antiviral activities. Final structures were prepared from 6-chloro (1), 5-chloro (2) or 3-chloro (3) derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide by nucleophilic substitution of chlorine with *n*-alkylamines in the range from butylamine to octylamine (labelled a–e). Series 1a–e and 2a–e exerted higher activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv compared to the corresponding pattern compounds and the reference compound pyrazinamide. The most active derivatives reached an activity MIC = 4.6–10 μM (*M. tbc* H37Rv). More importantly, activity was also observed against other tested mycobacterial strains (including drug-resistant strains). Substitution of 3-chlorine was disadvantageous and led to completely inactive compounds 3a–e. Some compounds showed activity against Gram-positive bacterial strains (including MRSA) or influenza virus, but no antifungal activity was observed.

Received 24th April 2015,
Accepted 18th May 2015

DOI: 10.1039/c5md00178a

www.rsc.org/medchemcomm

Introduction

Even in the 21st century, tuberculosis (TB) still remains a serious and global health threat. The absolute number of TB cases per year has been slightly decreasing since the beginning of this millennium,^{1,2} nevertheless in 2013 about 9 million new cases of TB were reported and associated with 1.5 million deaths.³ The alarming increase of drug-resistant strains underlines the need for new antituberculosis drugs.

One strategy to design potential new drugs is by structural-modification of known and therapeutically used drugs. Pyrazinamide (PZA) is a first-line antituberculous drug⁴ with multiple mechanisms of action. It acts under its parent form or as a prodrug metabolized to pyrazinoic acid

(POA).^{5–8} One of the confirmed mechanisms of action for both PZA and POA is the inhibition of mycobacterial fatty acid synthase I (FAS I), which leads to depletion of mycolic acid-essential components of the mycobacterial cell wall.⁹ Due to its simple structure, the PZA scaffold is, in theory, amenable to many diverse structural modifications.

Recently we reported that the antimycobacterial activity is enhanced by *n*-alkylamino substitution of the pyrazine.^{10–13} As Zitko *et al.* stated, this type of substitution also led to less toxic compounds compared to pattern chloropyrazine derivatives.¹³ To confirm this hypothesis, a series of 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (1a–e) and 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (2a–e) were designed and synthesized from their respective chloro-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (1, 2),¹⁴ which in our previous study exerted moderate antimycobacterial activity (MIC = 50–100 μM) against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.¹⁴ To fully understand the relationship between the position of the alkylamino chain and antimycobacterial activity, a series of 3-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (3a–e) was prepared as well.

All compounds were evaluated for activity against four standard mycobacterial strains and seven drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Additionally, their antibacterial, antifungal and antiviral activities were determined.

Triclosan (TCL) and its derivatives are known inhibitors of mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA).^{15–17} InhA belongs to the complex of fatty acid synthase II (FAS II) and is one of

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

E-mail: barbora.servusova@faf.cuni.cz, jan.zitko@faf.cuni.cz

^b Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska dolina, 842 15 Bratislava, Slovakia

^c Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, Bratislava, 832 32, Slovakia

^d Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven, 3000, Belgium

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed synthetic procedures, the analytical data of presented compounds as well as the biological methods and the docking procedure are available in the ESI. See DOI: 10.1039/c5md00178a

the crucial enzymes involved in the biosynthesis of mycolic acids (modification of fatty acids produced by FAS I).^{18,19} With respect to the alkylamino derivatives presented in this letter, it is very interesting that the 5-alkyl diphenyl ethers (Fig. 1) with a C₄ to C₈ alkyl chain possessed significantly lower IC₅₀ values in the InhA *in vitro* enzyme inhibition assay. Their inhibitory activity increased with growing alkyl chain and 5-octyl-2-phenoxyphenol possessed an IC₅₀ of 5 nM, which is a major improvement over TCL (IC₅₀ = 1000 nM).²⁰ The structural similarity between the 5-alkyl diphenyl ethers (as derivatives of TCL) and the 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (2a–e) presented in this article raised the question whether our compounds could possess the same mechanism of action as TCL and its alkyl derivatives, *i.e.* based on inhibition of InhA. To test this hypothesis, we performed molecular docking of selected compounds into mycobacterial InhA.

Results and discussion

Chemistry

The pattern compounds **1** and **2** were described previously,¹⁴ nevertheless the synthesis of compound **1** was modified. To increase the reaction yield, Schotten–Bauman conditions were applied. Excess of benzylamine was dissolved in water and added portionwise to 6-chloropyrazine-2-carbonyl chloride in dichloromethane. The reaction mixture was stirred for about 4 hours at RT. A portion of originating *N*-benzyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (**1**) reacted further with excess of benzylamine and yielded *N*-benzyl-6-benzylaminopyrazine-2-carboxamide (**1'**, Scheme 1) as an unintended side-product. Its structure was confirmed by NMR and MS analysis. Formation of this type of side-product was also observed during the synthesis of pattern compound **3**, for which the synthetic procedure is thoroughly explained in the ESI.†

The syntheses of compounds **1a–e** and **2a–e** were performed *via* an aminodehalogenation reaction, where corresponding pattern compound **1** or **2** was treated with 5 equivalents of the respective amine using triethylamine as a base (Scheme 2A). The reaction mixture was refluxed in a small amount of ethanol up to 8 hours as indicated by TLC (silica, hexane–EtOAc 2 : 1). The synthesis of final compounds **3a–e** was accelerated by microwave irradiation. Microwave conditions were determined experimentally in previous research,²¹ (Scheme 2B).

The crude products were absorbed on silica gel and purified by flash-chromatography (gradient elution, hexane–EtOAc). To remove residual non-aromatic amine, derivatives **1a–2e** were

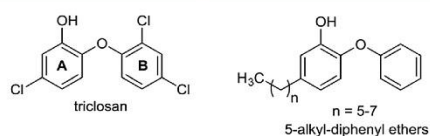
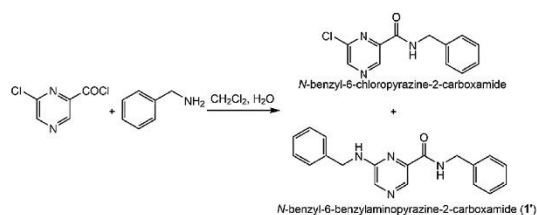


Fig. 1 Structures of triclosan (TCL) and its 5-alkyl derivatives with enoyl-ACP-reductase inhibitory activity.



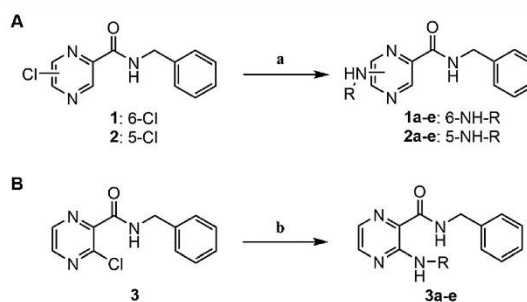
Scheme 1 Synthesis of pattern compound **1** and formation of side-product **1'**. Reaction proceeded under mild conditions – RT, 4 h. Side-product originated in the ratio 1 : 5 by substitution of chlorine on the pyrazine core with benzylamine.

recrystallized from ethanol. Compounds **1a–e** and **2a–e** were isolated as white solids, compounds **3a–e** as yellow liquids. The analytical data, which were fully consistent with the proposed structures, are included in the ESI.† The yields (chromatographically pure product) ranged from 37% to 80%.

Antimycobacterial activity

All the prepared compounds (including compounds **1**, **2** and **3**) as well as the clinically used standards PZA and isoniazid (INH) were evaluated using the microplate alamar blue assay (MABA)²² for activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb*), *M. kansasii* and two strains of *M. avium*. The results were expressed as minimal inhibitory concentration (MIC) in $\mu\text{g mL}^{-1}$ or μM (data in parentheses), Table 1. Both tested strains of *Mycobacterium avium* were completely resistant to the tested compounds (MIC >100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Comparing the results in μM , alkylamino derivatives **1a–e** and **2a–e** showed higher activity against *Mtb* H37Rv than the corresponding pattern compounds **1** (MIC = 50 μM) and **2** (MIC = 100 μM). For the most active derivatives **1d**, **1e** and **2c–e** (MIC = 4.6–10 μM), the activity was up to 20-times better compared to the clinically used drug PZA (MIC = 102 μM).

More importantly, compounds **1a–e** derived from *N*-benzyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (**1**) exhibited activity against *Mycobacterium kansasii* (naturally resistant to PZA,



Scheme 2 Syntheses of target structures. (A): Pattern compound **1** or **2** refluxed in EtOH with corresponding *n*-alkylamine up to 8 h, triethylamine (TEA) was used as a base (conditions a). (B): Microwave assisted syntheses of final compounds **3a–e**. Conditions b: 140 °C, 30 minutes, 120 W, MeOH, pyridine.

Table 1 Summary of prepared compounds. *In vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (*Mtb*) and *Mycobacterium kansasii*, MIC in $\mu\text{g mL}^{-1}$ or μM (data in parentheses). Cytotoxicity provided on different types of cells, expressed as CC_{50} or MCC in μM . Anti-influenza virus activity and cytotoxicity provided on MDCK cells, values in μM

No.	Log <i>k</i>	R	MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μM)		Cytotoxicity (μM)				Antiviral activity (μM)			
			<i>Mtb</i> H37Rv	<i>M.</i> <i>kansasii</i>	CRFK ^a CC_{50}	HEL ^b MCC	HeLa ^c MCC	Vero ^d MCC	MDCK ^e cytotoxicity		Antiviral EC_{50} ^f	
									CC_{50}	MCC	Influenza A/H1N1 (A/PR/8)	Visual CPE score
1	0.200	—	12.5 (50)	100 (404)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1'	0.483	6-Benzyl	50 (157)	>100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1a	0.549	6-C ₄ H ₉	12.5 (44)	50 (176)	>100	>100	>100	100	66	100	>100	>100
1b	0.768	6-C ₅ H ₁₁	12.5 (42)	25 (84)	>100	>100	>100	>100	33	20	>100	>100
1c	0.986	6-C ₆ H ₁₃	6.25 (20)	12.5 (40)	>100	>100	>100	100	9.5	20	>100	>100
1d	1.207	6-C ₇ H ₁₅	3.13 (10)	12.5 (38)	>100	>100	>100	>100	2.4	4.0	>100	>100
1e	1.431	6-C ₈ H ₁₇	3.13 (9.2)	6.25 (18)	>100	>100	>100	>100	1.3	4.0	>100	>100
2	0.186	—	25 (100)	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2a	0.424	5-C ₄ H ₉	25 (88)	>100	>100	>100	>100	>100	57	100	>100	>100
2b	0.638	5-C ₅ H ₁₁	6.25 (21)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	37	3.3
2c	0.859	5-C ₆ H ₁₃	3.13 (10)	>100	>100	>100	>100	≥100	>100	>100	52	62
2d	1.089	5-C ₇ H ₁₅	3.13 (10)	>100	>100	>100	>100	≥100	>100	>100	21	47
2e	1.312	5-C ₈ H ₁₇	1.56 (4.6)	>100	28	100	100	20	62	≥20	1.1	>100
3	n.d.	—	12.5 (50)	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3'	1.040	3-Benzyl	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	20	>100	>100
3a	1.081	3-C ₄ H ₉	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
3b	1.321	3-C ₅ H ₁₁	>100	>100	>100	≥100	>100	>100	>100	≥20	>100	>100
3c	1.564	3-C ₆ H ₁₃	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100	>100
3d	1.809	3-C ₇ H ₁₅	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	>100	>100
3e	2.054	3-C ₈ H ₁₇	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100
PZA	-0.687	—	12.5 (102)	>100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
INH	-0.743	—	0.39 (2.8)	1.56 (11)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Log *k* stated as average of $n = 3$, SD values were negligible, relatively ranging from 0.01 to 0.19%.^a Crandell feline kidney cells. ^b Human embryonic lung fibroblasts. ^c Human cervix epithelial cells. ^d African green monkey kidney cells. ^e Madin canine kidney cells. ^f EC_{50} – concentration producing 50% inhibition of virus-induced cytopathic effect (CPE), as determined by visual scoring of the CPE or by measuring the cell viability with colorimetric formazan-based MTS assay. n.d. not done. MCC – compound concentration producing minimal changes in cell morphology estimated by the MTS cell viability assay.

MIC > 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), while 5-alkylamino isomers (2a–e) as well as 3-alkylamino isomers (3a–e) were completely inactive (MIC > 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Actually, compounds 3a–e derived from *N*-benzyl-3-chloropyrazine-2-carboxamide (3) did not exhibit activity against any tested mycobacterial strain.

In concordance with previously published studies on alkylamino derivatives of PZA,^{10–13} the activity of 6-alkylamino (1a–e) and 5-alkylamino (2a–e) isomers depended on the length of the alkyl chain and culminated in compounds with hexyl- to octylamino substitution. Chart 1 shows the correlation between lipophilicity (expressed as log *k*) and antimycobacterial activity against *Mtb* (for compounds 1a–e and 2a–e) and *M. kansasii* (for compounds 1a–e).

All alkylamino derivatives 1a–e, 2a–e and 3a–e were evaluated for activity against resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. As shown in Table 2, the 6- and 5-alkylamino derivatives exhibited activity, which was again dependent on the length of the alkyl chain, *i.e.* compounds with a C₆–C₈ chain (labelled c–e) exhibited the highest activity. Examples of correlation between lipophilicity and activity against resistant strains are included in the ESI.† The 5-isomers (2a–e) showed higher activity compared to their respective 6-isomers

(1a–e). Poor activity was observed for compound 3a (*N*-benzyl-3-butylpyrazine-2-carboxamide), while the rest of the 3-alkylamino derivatives were inactive (MIC ≥ 1000 μM).

Simoes *et al.*²³ reported a series of amides of pyrazinoic acid, which exhibited very slow hydrolysis in the plasma, rat

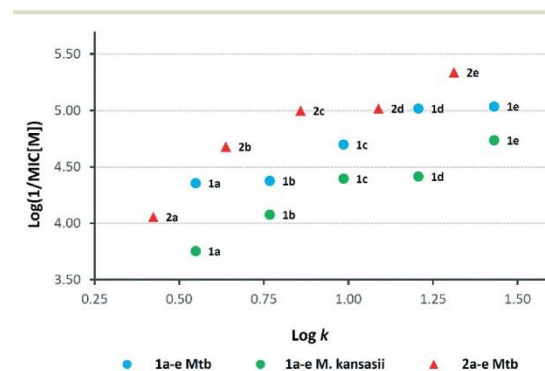


Chart 1 Correlation between antimycobacterial activity and lipophilicity expressed as log *k*.

Table 2 Antimycobacterial activity against drug-resistant strains, minimal inhibitory concentrations in μM

MIC (μM)		<i>Mtb</i> 7357/1998		<i>Mtb</i> 234/2005		<i>Mtb</i> 9449/2007		<i>Mtb</i> 8666/2010		<i>Mtb</i> Praha 1		<i>Mtb</i> Praha 4		<i>Mtb</i> Praha131	
No.	R	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d	14 d	21 d
1a	6-C ₄ H ₉	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	125	62.5	62.5	62.5	62.5	32	62.5	32	62.5
1b	6-C ₃ H ₁₁	32	62.5	62.5	62.5	32	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	32	62.5	32	62.5
1c	6-C ₆ H ₁₃	32	32	16	32	32	32	16	32	16	32	32	32	16	32
1d	6-C ₇ H ₁₅	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	8	16	8	16
1e	6-C ₈ H ₁₇	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
2a	5-C ₄ H ₉	125	125	125	250	62.5	125	125	250	125	250	62.5	125	62.5	125
2b	5-C ₅ H ₁₁	16	32	16	32	16	32	16	32	16	32	16	32	16	16
2c	5-C ₆ H ₁₃	8	8	4	8	8	8	4	8	4	8	8	8	4	4
2d	5-C ₇ H ₁₅	4	8	4	4	4	8	4	4	4	4	4	8	2	4
2e	5-C ₈ H ₁₇	8	8	4	8	8	8	4	8	4	8	8	8	4	4
3a	3-C ₄ H ₉	125	250	125	250	125	250	125	250	125	125	125	125	125	250
3b	3-C ₃ H ₁₁	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³
3c	3-C ₆ H ₁₃	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³
3d	3-C ₇ H ₁₅	10 ³	10 ³	10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	10 ³	>10 ³
3e	3-C ₈ H ₁₇	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³	>10 ³
INH		16	32	16	16	16	16	16	32	16	16	16	16	16	16

MDR-TB strains: 234/2005 and 7357/1998 both resistant to INH, rifampicin (RIF), rifabutin, streptomycin, ethambutol and ofloxacin; Praha 1 resistant to INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol and clofazimine; 8666/2010 resistant to INH, RIF, rifabutin; 9449/2007 and Praha 4 both resistant to INH, RIF, rifabutin, ethambutol and streptomycin. XDR-TB strain: Praha 131 resistant to INH, RIF, rifabutin, streptomycin, ethambutol, ofloxacin, gentamicin and amikacin.

liver homogenate and were even stable in *M. smegmatis* homogenate. These derivatives failed in antimycobacterial testing and Simoes *et al.*²³ assumed that the lack of activity is caused by insufficient rate of hydrolysis to POA. Our derivatives are sterically more demanding (large substituent on the carboxamide moiety) than the simple amides tested by Simoes *et al.*,²³ therefore their stability (resistance to amidases) is expected to be even higher. According to the results²³ and previously published studies,^{12,24} we do not expect that the presented derivatives are hydrolyzed to their corresponding pyrazinecarboxylic acids.

Antibacterial and antifungal activities

The studied compounds were evaluated against eight bacterial and eight fungal strains (see the ESI† for the complete list of tested strains). All fungal strains as well as Gram-negative strains were completely insensitive to the tested compounds (MIC > 500 μM). Compounds 1a–e exhibited moderate or weak activity against Gram-positive strains including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Notably, compound 1e (*N*-benzyl-6-octylpyrazine-2-carboxamide) displayed activity against *S. aureus* (MIC = 3.9 μM) comparable to the reference compounds (see the ESI†).

Toxicity assay

In vitro cytotoxicity^{25–27} assays on several cell lines were performed for compounds 1a–e, 2a–e and 3a–e. The results (Table 1) were expressed as the concentration causing minimal changes in cell morphology (MCC) or as 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) – a concentration reducing cell viability

by 50% as assessed by a colorimetric formazan assay. Except for compound 2e, the tested compounds were not cytotoxic in CRFK, HEL, HeLa and Vero cell lines at the highest concentration tested, *i.e.* 100 μM .

Antiviral activity

In addition, we determined whether any of the studied compounds has potential activity against diverse DNA and RNA viruses. The virus panel (see the ESI† for the full list) included pathogens of medical importance such as herpesviruses, HIV and influenza virus. Most compounds did not produce any visible antiviral activity. The notable exception was series 2b–e which was moderately active against the influenza virus, with 2e being the most potent one (Table 1). The latter compound also inhibited the replication of respiratory syncytial virus (data not shown) with an antiviral EC₅₀ value of 8.9 μM . The basis for the antiviral effect of 2b–e remains to be identified.

Docking

To perform the docking studies, we selected the derivatives with the highest antimycobacterial activity in the whole cell assay, *i.e.* hexylamino to octylamino derivatives (1c–e, 2c–e). We included their corresponding 3-alkylamino isomers (3c–3e) to test the influence of the position of the alkylamino chain on the docking results. Out of the large number of crystal structures of InhA available from the Protein Data Bank, we chose PDB entry: 2X23. This structure is a closed form of the enzyme co-crystallized with inhibitor PI70, which is a

slow and tight-binding inhibitor with an alkyl diphenyl ether structure.²⁸

To verify the docking procedure, the co-crystallized ligand (PT70) from the PDB structure was removed and redocked using Glide XP mode docking protocol with flexible sampling of ligand. The RMSD of the core atoms of the ligand (omitting the atoms of the flexible alkyl chain) was approx. 0.26 Å. According to the results of the molecular docking (Fig. 2A), the 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (1c–e) and 5-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (2c–e) may exert interactions typical for TCL-based inhibitors of mycobacterial enoyl-ACP-reductase InhA.^{20,28} The carboxamide oxygen of the presented compounds plays the same role as the phenolic oxygen of TCL, *i.e.* to act as an H-bond acceptor, forming interactions with the –OH group of Tyr158 and the 2'-hydroxyl of the ribose of NAD⁺. The pyrazine core of the title compounds is oriented similarly to the phenol aromatic ring of the TCL derivatives (the so called A-ring) and shows a π - π stacking interactions with the nicotinamide core of NAD⁺, and π - π edge-to-face interactions with Phe149. The benzyl core of the discussed derivatives occupies the same hydrophobic cavity as the B-ring of the TCL derivatives. The planes of the (hetero)aromatic rings of the title compounds are almost identical to the corresponding planes of PT70 (Fig. 2B). The alkylamino chain is placed in the tunnel leading to the enzyme's surface, in the same manner as the alkyl chain of PT70 and similar TCL derivatives. This hydrophobic entry tunnel hosts the lipophilic chain of the mycolic acid intermediate, which is the substrate of the InhA enzyme. The docking scores of the presented compounds (see the ESI†) were close to the score of the co-crystallized ligand PT70 (the best score was predicted for 1e, XP GScore = –9.705; the XP GScore of PT70 was –10.543).

On the contrary, the 3-alkylamino derivatives 3c–e were not able to orient inside the cavity of the active site in a manner similar to PT70, and had low docking scores (XP GScore from –3.692 for 3c to –6.175 for 3e). Apparently, the presence of two large substituents (benzyl and alkylamino chain) on neighbouring atoms C2 and C3 of the pyrazine core leads to a molecular shape that is not compatible with the cavity.

To summarize, compounds 1c–e and 2c–e showed all important ligand–enzyme interactions of triclosan and

therefore could be potential inhibitors of InhA. This hypothesis was tested *via* analysis of mycolic acid production in the strain of *M. tuberculosis* H37Ra treated with compounds 1d and 2e as described in the following paragraph. These derivatives were chosen according to their MIC values for *M. tuberculosis* H37Rv and selectivity to the mycobacterial strains. The XP GScore was not taken as the main criterion for selection, having in mind that derivatives with longer alkyl chain will have a higher score caused mainly by non-specific hydrophobic interactions with the enzyme. Compound 1e (reaching the highest XP GScore) was excluded from the screening due to low selectivity (antibacterial and antiviral activities).

Effect on mycolic acid production

The effect of compounds 1d and 2e on mycolic acid synthesis was evaluated by metabolic labelling of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra with ¹⁴C acetate. Derivatized radiolabeled fatty/mycolic acids were separated by thin layer chromatography (TLC) and visualized by autoradiography. Isoniazid (INH)-inhibiting mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA)²⁹ was used as a control drug. As expected, the treatment of *Mtb* with INH led to the inhibition of the synthesis of all types of mycolic acids and the production of short chain fatty acids was not affected. The compounds 1d and 2e did not affect mycolic acid synthesis (Fig. 3).

Lipophilicity

Lipophilicity parameter *C*log*P* was calculated by CS ChemBioDraw Ultra version 14.0. (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). Additionally, the lipophilicity was measured experimentally by RP-HPLC and expressed as log*k* derived from the retention times of individual compounds. Correlation between the calculated *C*log*P* and the experimentally determined log*k* values showed linearity inside the series of positional isomers. As discussed in the ESI†, the *C*log*P* algorithm did not correctly reflect the influence of the position of the alkylamino substituent on a compound's lipophilicity. Therefore log*k* is more useful for interseries comparisons and is used as the main lipophilicity parameter in this manuscript.

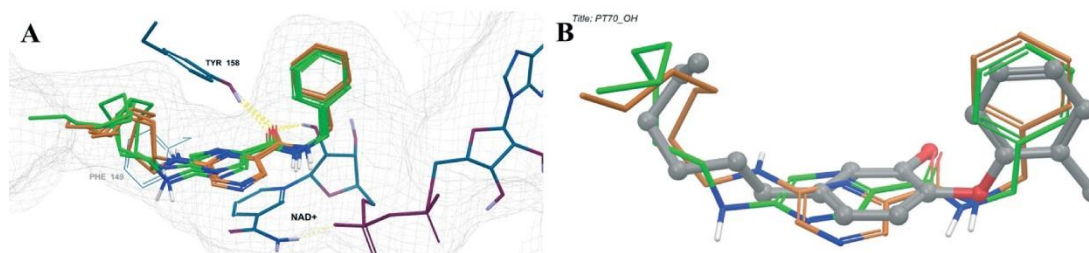


Fig. 2 (A) Compounds 1c–e (orange carbons) and 2c–e (green carbons) docked into the active site of mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA, PDB: 2X23). (B) Predicted poses of 1e (orange carbons) and 2e (green carbons) in comparison with the co-crystallized inhibitor PT70 (grey balls and sticks).

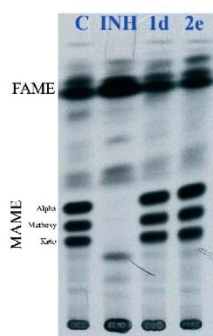


Fig. 3 Analysis of the effects of **1d** and **2e** on mycolic acid synthesis. The autoradiograph of TLC with separated fatty acid methyl esters (FAME) and mycolic acid methyl esters (MAME) obtained from [1,2-¹⁴C]-acetate-labelled *Mtb* H37Ra strain treated with **1d**, **2e** or INH in final concentration of 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Line C - untreated control.

Conclusions

To conclude, substitution of 6-chlorine or 5-chlorine with *n*-alkylamino substituent yielded derivatives with comparable or increased activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv compared to the corresponding pattern compounds **1** and **2**. No significant differences between 6-alkylamino (**1a–e**) and 5-alkylamino (**2a–e**) isomers were observed. Generally, activity increased with prolongation of the alkyl chain (corresponding to the increase in lipophilicity) and culminated in compounds with heptylamino (**1d**, **2d**) and octylamino (**1e**, **2e**) substitution. The series of 6-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides (**1a–e**) also exerted activity against *Mycobacterium kansasii*, which is naturally resistant to pyrazinamide.

The 6-alkylamino and 5-alkylamino isomers also showed activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* culminating in heptyl/octylamino derivatives, where the 5-alkylamino isomers exhibited marginally higher activity compared to the 6-isomers.

On the contrary to series **1** and **2**, substitution of chlorine with an alkylamino substituent in *N*-benzyl-3-chloropyrazine-2-carboxamide (**3**, MIC = 12.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *Mtb*), led to inactive 3-alkylamino derivatives (**3a–e**).

In vitro activity of PZA is strongly dependent on pH and decreases with the increase in pH. The MIC value for PZA was in accordance with the literature.^{23,30,31}

The studied compounds exhibited no antifungal activity and mostly no significant antibacterial activity. The only exception was compound **1e** (*N*-benzyl-6-octylpyrazine-2-carboxamide), showing activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 3.9 μM).

Side-products **1'** and **3'** occurring during the synthesis of pattern compounds **1** and **3** were evaluated for their biological activities and no significant activity was observed.

Based on the results of the *in vitro* cytotoxicity assays, we assume that the presented derivatives are non-toxic.

Molecular docking of compounds **1e–e** and **2e–e** suggested potential inhibition of mycobacterial enoyl-ACP-reductase. In

view of these results, an *in vitro* study was performed. However, no effect on mycolic acid synthesis was observed for selected compounds **1d** and **2e**.

Acknowledgements

The publication is co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic (project no. CZ.1.07/2.3.00/20.0235, the title of the project: TEAB and project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0022). This study was also supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA NZ 13346), Grant Agency of Charles University B-CH/710312 and SVV 260 183. This work was supported by grant VEGA 1/0743/13. The computations were performed on the HPC resources at the Toxicological and Antidoping Center (TAC) of the Faculty of Pharmacy UK in Bratislava.

Notes and references

- World Health Organization, *Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing*, WHO, Report 2002. WHO/CDS/TB/2002.295.
- World Health Organization, *Global Tuberculosis*, Report 2012. WHO/HTM/TB/2012.6.
- World Health Organization, *Global Tuberculosis*, Report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08.
- C. H. S. Lima, M. L. F. Bispo and M. V. N. de Souza, *Rev. Virtual Quím.*, 2011, 3, 159.
- Y. Zhang and D. Mitchison, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2003, 7, 6.
- Y. Zhang, M. M. Wade, A. Scorpio, H. Zhang and Z. Sun, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003, 52, 790.
- H. Sayahi, O. Zimhony, W. R. Jacobs, A. Shekhtman and J. T. Welch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21, 4804.
- W. Shi, W. Zhang, X. Jiang, H. Yuan, J. S. Lee, C. E. Barry, H. H. Wang, W. H. Zhang and Y. Zhang, *Science*, 2011, 333, 1630.
- P. J. Brennan, *Tuberculosis*, 2003, 83, 91.
- J. Zitko, M. Doležal, M. Svobodová, M. Vejsová, J. Kuneš, R. Kučera and P. Jílek, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 19, 1471.
- J. Zitko, J. Jampilek, L. Dobrovolný, M. Svobodová, J. Kuneš and M. Doležal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 1598.
- B. Servusová, P. Paterová, J. Mandíková, V. Kubiček, R. Kučera, J. Kuneš, M. Doležal and J. Zitko, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 450.
- J. Zitko, B. Servusová, A. Janoutová, P. Paterová, J. Mandíková, V. Garaj, M. Vejsová, J. Marek and M. Doležal, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 174.
- B. Servusová, D. Eibinová, M. Doležal, V. Kubiček, P. Paterová, M. Peško and K. Králová, *Molecules*, 2012, 17, 13183.
- J. S. Freundlich, F. Wang, C. Vilcheze, G. Gulien, R. Langley, G. A. Schiehser, D. R. Jacobus, W. R. Jacobs and J. C. Sacchettini, *ChemMedChem*, 2009, 4, 241.
- S. R. Luckner, N. Liu, C. W. am Ende, P. J. Tonge and C. Kisker, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 14330.

- 17 H. Marrakchi, G. Laneelle and A. Quemard, *Microbiology*, 2000, **146**, 289.
- 18 K. Takayama, C. Wang and G. S. Besra, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, **18**, 81.
- 19 H. Marrakchi, M. A. Lan elle and M. Daff , *Chem. Biol.*, 2014, **21**, 67.
- 20 T. J. Sullivan, J. J. Truglio, M. E. Boyne, P. Novichenok, X. Zhang, C. F. Stratton, H. J. Li, T. Kaur, A. Amin, F. Johnson, R. A. Slayden, C. Kisker and P. J. Tonge, *ACS Chem. Biol.*, 2006, **1**, 43.
- 21 O. Jandourek, M. Dolezal, J. Kunes, V. Kubicek, P. Paterova, M. Pesko, V. Buchta, K. Kralova and J. Zitko, *Molecules*, 2014, **19**, 9318.
- 22 S. G. Franzblau, R. S. Witzig, J. C. McLaughlin, P. Torres, G. Madico, A. Hernandez, M. T. Degnan, M. B. Cook, V. K. Quenzer, R. M. Ferguson and R. H. Gilman, *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 362.
- 23 M. F. Simoes, E. Valente, M. J. Rodriguez Gomez, E. Anes and L. Constantino, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, **37**, 257.
- 24 B. Servusova-Vanaskova, P. Paterova, V. Garaj, J. Mandikova, J. Kunes, L. Naesens, P. Jilek, M. Dolezal and J. Zitko, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, DOI: 10.1111/cbdd.12536, in press.
- 25 L. Naesens, C. E. Stephens, G. Andrei, A. Loregian, L. De Bolle, R. Snoeck, J. W. Sowell and E. De Clercq, *Antiviral Res.*, 2006, **72**, 60.
- 26 L. Naesens, E. Vanderlinden, E. Roth, J. Jeko, G. Andrei, R. Snoeck, C. Pannecouque, E. Illyes, G. Batta, P. Herczegh and F. Sztaricskai, *Antiviral Res.*, 2009, **82**, 89.
- 27 E. Vanderlinden, F. G ktas, Z. Cesur, M. Froeyen, M. L. Reed, C. J. Russell, N. Cesur and L. Naesens, *J. Virol.*, 2010, **84**, 4277.
- 28 S. R. Luckner, N. N. Liu, C. W. am Ende, P. J. Tonge and C. Kisker, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 14330.
- 29 C. Vilcheze, F. Wang, M. Arai, M. H. Hazb n, R. Colangeli, L. Kremer, T. R. Weisbrod, D. Alland, J. C. Sacchettini and W. R. Jacobs, *Nat. Med.*, 2006, **12**, 1027.
- 30 M. Salfinger and L. B. Heifets, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 1002.
- 31 Y. Zhang, S. Permar and Z. Sun, *J. Med. Microbiol.*, 2002, **51**, 42.

Supplementary information

Alkylamino derivatives of *N*-benzylpyrazine-2-carboxamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation.

Barbora Servusova-Vanaskova,^{*a} Ondrej Jandourek,^a Pavla Paterova,^a Jana Kordulakova,^b Magdalena Plevakova,^a Vladimir Kubicek,^a Radim Kucera,^a Vladimir Garaj,^c Lieve Naesens,^d Jiri Kunes,^a Martin Dolezal^a and Jan Zitko^a

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

^b Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynska dolina, 84215 Bratislava, Slovakia

^c Faculty of Pharmacy, Comenius University, Odbojárov 10, Bratislava, 832 32, Slovakia

^d Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10, Leuven, 3000, Belgium

General

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Höhenkirchen, Germany). All organic solvents used for the synthesis were of analytical grade. The reactions were monitored using Merck Silica 60 F₂₅₄ TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were purified using automated chromatograph CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA) using columns filled with Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm (Merck, Darmstadt, Germany); gradient elution (hexane/ethyl-acetate), detection wavelength 260 nm, monitor wavelength 280 nm. NMR analysis was performed on Varian Mercury VX-BB 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C. Chemical shifts were recorded as δ values in parts per million (ppm) and were indirectly referenced to tetramethylsilane (TMS). IR spectra were measured in ATR mode using a Ge crystal-plate on Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA). The mass spectra were recorded in the mixture of MeOH, H₂O, formic acid (80:20:0.02 v/v) using LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The electrospray ionisation was performed in the positive mode. Melting points were determined on Stuart SMP30 melting point apparatus (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) and are uncorrected. Yields refer to chromatographically pure products after all purification operations. The synthesis of comp. **3a-e** took place in microwave reactor with focused field CEM Discover (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) connected with autosampler Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) and equipped with CEM's Synergy™ software for monitoring the reaction progress.

General synthetic procedures

Synthesis of starting compound 1 and 2

Synthesis of parent compounds **1** and **2** was described previously.¹ Briefly, for synthesis of compound **1**, 20 mmol of 6-chloropyrazine-2-carboxylic acid² was dissolved in anhydrous toluene, treated with thionyl chloride (3 eq., 60 mmol) and heated for about 1.5 h under reflux. Then, the excess of thionyl chloride was removed by repeated evaporation with anhydrous toluene *in vacuo*. Originated acyl chloride was directly used without any purification in the subsequent step. Benzylamine (1.5 eq., 30 mmol) and TEA (1 eq., 20 mmol) were dissolved in water and added portion-wise to acyl chloride in dichloromethane (Schotten-Baumann biphasic conditions). Reaction mixture was then stirred at RT for 4 h and monitored using TLC with hexane/ethyl acetate 2:1. Organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, adsorbed on silica purified using flash-chromatography. Side-product, later identified as *N*-benzyl-6-benzylaminopyrazine-2-carboxamide (**1'**), occurred during the synthesis of parent compound (**1**).

For compound **2**, 5-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (Sigma-Aldrich) was used as starting material for synthesis of 5-chloropyrazine-2-carbonyl chloride.³ During the reaction with thionyl chloride, the formation of acyl chloride occurs simultaneously with the nucleophilic substitution of the hydroxyl group for chlorine. *N,N*-Dimethylformamide (DMF) was added to the reaction mixture as catalyst.⁴ Second step of the synthesis proceeded under mild conditions: 1.5 eq. of benzylamine (MW = 107.15 g/mol) was dissolved in anhydrous acetone with TEA (1 eq.) and added drop-wise to the stirred solution of acyl chloride. The reaction mixture was stirred at RT for about 4 h and monitored using TLC with hexane/ethyl acetate 2:1 mixture as eluent. After this time small amount of silica gel was added and solvents were evaporated under reduced pressure. Adsorbed mixture was addressed to flash column chromatography.

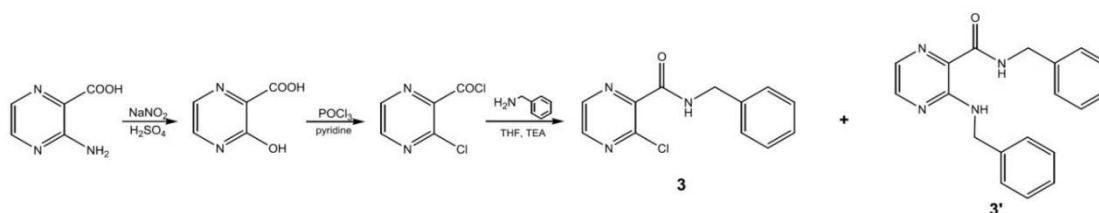
Synthesis of final compounds 1a-e and 2a-e

To synthesize final compounds, 1 mmol of *N*-benzyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (**1**) or *N*-benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamide (**2**) was dissolved in ethanol with TEA (1 eq., 1 mmol). Five molar equivalents of corresponding non-aromatic amine were added to the reaction mixture and refluxed in small amount of ethanol generally for 8 hours. The completion of the reaction was checked by TLC chromatography (eluent: hexane/ethyl acetate, 1:1). The crude product was adsorbed on silica gel by solvent

evaporation and purified by flash chromatography (hexane/ethyl acetate gradient elution). To remove residual non-aromatic amine, final compounds were recrystallized from ethanol.

Synthesis of starting compound 3

N-benzyl-3-chloropyrazine-2-carboxamide (**3**) was synthesised in three step reaction. The first step was based on diazotation reaction. 3-Aminopyrazine-2-carboxylic acid (50 mmol) was added in small amounts into the cooled concentrated sulphuric acid (30 mL) being stirred. Then the nitrosylsulphuric acid was prepared by cooling the concentrated sulphuric acid (37.5 mL) to 0 °C and adding sodium nitrite (50 mmol) portion-wise over a period of 15 minutes. The nitrosylation mixture (0-2 °C) was added drop-wise to the cold solution of 3-aminopyrazine-2-carboxylic acid and stirred again for 15 minutes. Then mixture was poured portion-wise on cracked ice and stirred until the end of nitrogen evolution. Strongly acidic suspension was filtered by suction and the collected solid was washed with distilled water to become free of acid and then dried.⁵ Crude 3-hydroxypyrazine-2-carboxylic acid was purified by recrystallization from water. Next step was the preparation of 3-chloropyrazine-2-carboxyl chloride. 3-Hydroxypyrazine-2-carboxylic acid (7 mmol) was dissolved in phosphoryl chloride (13 mL), few drops of pyridine were added and the mixture was stirred and heated to reflux for 2 hours.⁶ The excess of POCl₃ was evaporated under reduced pressure to give 3-chloropyrazine-2-carboxylic acid chloride. Crude acyl chloride was dissolved in dry THF, and benzylamine (5 eq., 35 mmol) together with TEA (2 eq., 10 mmol) in small amount of dry THF were added portion-wise. The mixture was stirred at room temperature for 3 hours, then adsorbed on silica gel and purified by preparative flash-chromatography. As described previously for synthesis of compound **1**, side-product (**3'**), emerging during aminodehalogenation reaction where both chlorines were substituted with benzylamine, was observed (**Scheme 1**).



Scheme 1. Synthesis of parent compound **3** and its side-product **3'**.

Synthesis of final compounds 3a-e

N-benzyl-3-chloropyrazine-2-carboxamide (**3**, 1.2 mmol) was treated with respective aliphatic amine (2 eq., 2.4 mmol) to yield 3-alkylamino-*N*-benzylpyrazine-2-carboxamides. All reactions were performed in the microwave reactor with focused field. Conditions (experimentally determined in previous research)⁷: 140°C, 30 minutes, 120 W, methanol (solvent, 3 mL), pyridine (1 eq., 1.2 mmol). The progress of reaction was monitored with TLC using the system hexane/ethyl acetate (1:1). The crude product was purified with flash column chromatography (silica, gradient elution hexane/ethyl acetate).

Analytical data

N-benzyl-6-chloropyrazine-2-carboxamide (**1**)

Analytical data in accordance with previously published results¹ (NMR spectra measured under different conditions). White solid. Yield: 63 %; m.p. 58.1-58.9 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.33 (s, 1H, H3), 8.74 (s, 1H, H5), 7.97 (bs, 1H, CONH), 7.43–7.20 (m, 5H, ArH), 4.67 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.56, 147.47, 147.25, 143.88, 142.03, 137.36, 128.76, 127.89, 127.74, 43.57. Log *k* = 0.200; CLog*P* = 2.385.

N-benzyl-6-benzylaminopyrazine-2-carboxamide (**1'**)

White solid. Identified side-product; m.p. 132.8-134.1 °C; IR (cm⁻¹): 3340 (NH), 3309 (NH), 3032, 2935, 1655 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 8.23 (s, 1H, H3), 8.13 (s, 1H, H5), 7.89 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 7.42 – 7.17 (m, 10H, ArI, Ar'II), 4.63 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 4.49 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163.95, 153.48, 141.49, 139.85, 139.64, 136.80, 129.58, 128.47, 128.01, 127.44, 127.35, 127.05, 126.97, 43.78, 42.33. Anal. Calcd. For C₁₉H₁₈N₄O (318.38): 71.68% C, 5.70% H, 17.60% N; Found: 71.61% C, 5.68% H, 17.49% N. MS (ESI, Pos.): *m/z* 319.39 (M+H)⁺. Log *k* = 0.483; CLog*P* = 3.914.

N-benzyl-6-butylaminopyrazine-2-carboxamide (**1a**)

White solid. Yield: 41%; m.p. 94.6-95.9 °C; IR (cm⁻¹): 3320 (NH), 3087, 2960, 2930, 2863, 1655 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H, H3), 8.05 (s, 1H, H5), 7.99 (bs, 1H, CONH), 7.37 – 7.27 (m, 5H, ArH), 4.99 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 4.65 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.27 – 3.17 (m, 2H, CH₂), 1.66 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.41 (m, 2H, CH₂), 0.98 – 0.83 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.79, 152.90, 141.44, 138.09, 134.78, 130.97, 128.69, 127.63, 127.48, 43.24, 41.12, 31.24, 20.06, 13.74. Anal. Calcd. For C₁₆H₂₀N₄O (284.36): 67.58% C, 7.09% H, 19.70% N; Found: 67.61% C, 7.08% H, 19.69% N. MS (ESI, Pos.): *m/z* 285.20 (M+H)⁺. Log *k* = 0.549; CLog*P* = 4.053.

N-benzyl-6-pentylaminopyrazine-2-carboxamide (**1b**)

White solid. Yield: 39%; m.p. 72.5-73.4 °C; IR (cm⁻¹): 3324 (NH), 3063, 2964, 2929, 2859, 1655 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H, H3), 8.02 (s, 1H, H5), 8.00 (bs, 1H, CONH), 7.39 – 7.24 (m, 5H, ArH), 4.85 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, NH), 4.65 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.32 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 1.68 – 1.55 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.25 (m, 4H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃);

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.93, 152.77, 141.14, 138.11, 135.11, 131.56, 128.67, 127.61, 127.45, 43.21, 41.39, 29.04, 28.89, 22.32, 13.92. Anal. Calcd. For C₁₇H₂₂N₄O (298.38): 68.43% C, 7.43% H, 18.78% N; Found: 68.25% C, 7.45% H, 18.90% N. MS (ESI, Pos.): m/z 299.22 (M+H)⁺. Log *k* = 0.768; CLog*P* = 4.582.

N-benzyl-6-hexylaminopyrazine-2-carboxamide (**1c**)

White solid. Yield: 37%; m.p. 75.7-76.2 °C; IR (cm⁻¹): 3330 (NH), 3054, 2929, 2857, 1656 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (s, 1H, H3), 8.01 (s, 1H, H5), 8.00 (bs, 1H, CONH), 7.37 – 7.26 (m, 5H, ArH), 4.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 4.65 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.32 (td, *J* = 7.1, 5.5 Hz, CH₂), 1.67 – 1.55 (m, 2H, CH₂), 1.43 – 1.22 (m, 6H, CH₂), 0.91 – 0.84 (m, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.93, 152.75, 141.16, 138.15, 135.06, 131.69, 128.68, 127.63, 127.46, 43.22, 41.48, 31.45, 29.20, 26.61, 22.51, 13.96. Anal. Calcd. For C₁₈H₂₄N₄O (312.41): 69.20% C, 7.74% H, 17.93% N; Found: 69.18% C, 7.79% H, 18.01% N. MS (ESI, Pos.): m/z 313.25 (M+H)⁺. Log *k* = 0.986; CLog*P* = 5.111.

N-benzyl-6-heptylaminopyrazine-2-carboxamide (**1d**)

White solid. Yield: 40%; m.p. 60.9-61.7 °C; IR (cm⁻¹): 3399 (NH), 3336 (NH), 3030, 2929, 2858, 1665 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (s, 1H, H3), 8.01 (s, 1H, H5), 8.00 (bs, 1H, CONH), 7.37 – 7.26 (m, 5H, ArH), 4.80 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 4.65 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.32 (td, *J* = 7.1, 5.5 Hz, 2H, CH₂), 1.67 – 1.55 (m, 2H, CH₂), 1.42 – 1.19 (m, 8H, CH₂), 0.92 – 0.83 (m, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.94, 152.76, 141.15, 138.15, 135.08, 131.67, 128.68, 127.63, 127.46, 43.22, 41.47, 31.68, 29.25, 28.96, 26.90, 22.53, 14.03. Anal. Calcd. For C₁₉H₂₆N₄O (326.44): 69.91% C, 8.03% H, 17.16% N; Found: 69.79% C, 7.97% H, 17.09% N. MS (ESI, Pos.): m/z 327.23 (M+H)⁺. Log *k* = 1.207; CLog*P* = 5.640.

N-benzyl-6-octylaminopyrazine-2-carboxamide (**1e**)

White solid. Yield: 63%; m.p. 62.1-62.7 °C; IR (cm⁻¹): 3394 (NH), 3334 (NH), 2929, 2854, 1666 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.61 (s, 1H, H3), 8.05 (s, 1H, H5), 7.99 (bs, 1H, CONH), 7.39 – 7.27 (m, 5H, ArH), 4.95 (bs, 1H, NH), 4.65 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.32 (td, *J* = 7.1, 5.5 Hz, 2H, CH₂), 1.68 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.44 – 1.15 (m, 10H, CH₂), 0.87 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.83, 152.87, 141.40, 138.11, 134.81, 131.09, 128.69, 127.61, 127.47, 43.22, 41.47, 31.72, 29.25, 29.20, 29.15, 26.94, 22.59, 14.05. Anal. Calcd. For C₂₀H₂₈N₄O (340.46): 70.56% C, 8.29% H, 16.46% N; Found: 70.51% C, 8.37% H, 16.39% N. MS (ESI, Pos.): m/z 341.25 (M+H)⁺. Log *k* = 1.431; CLog*P* = 6.169.

N-benzyl-5-chloropyrazine-2-carboxamide (**2**)

Analytical data in accordance with previously published results.¹ White solid. Yield: 68%; m.p. 102.3-103.0 °C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.26 (s, 1H, H3), 8.61 (s, 1H, H6), 7.97 (bs, 1H, NH), 7.48–7.23 (m, 5H, ArH), 4.65 (d, *J* = 6.0 Hz, CH₂Ar); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 162.10, 151.93, 144.36, 142.71, 142.39, 137.34, 128.70, 128.01, 127.65, 43.55. Log *k* = 0.186; CLog*P* = 2.385.

N-benzyl-5-butylaminopyrazine-2-carboxamide (**2a**)

White solid. Yield: 78%; m.p. 120.1-121.2 °C; IR (cm⁻¹): 3399 (NH), 3306 (NH), 3027, 2951, 2922, 2865, 1661 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H, H3), 7.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 7.69 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H6), 7.37 – 7.27 (m, 5H, ArH), 5.21 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 4.63 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.40 (td, *J* = 7.2, 5.7 Hz, 2H, CH₂), 1.68 – 1.56 (m, 2H, CH₂), 1.50 – 1.33 (m, 2H, CH₂), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.14, 155.75, 143.07, 138.43, 133.18, 129.12, 128.60, 127.73, 127.32, 43.14, 41.27, 31.33, 20.03, 13.73. Anal. Calcd. For C₁₆H₂₀N₄O (284.36): 67.58% C, 7.09% H, 19.70% N; Found: 67.65% C, 7.00% H, 19.63% N. MS (ESI, Pos.): m/z 285.10 (M+H)⁺. Log *k* = 0.424; CLog*P* = 4.053.

N-benzyl-5-pentylaminopyrazine-2-carboxamide (**2b**)

White solid. Yield: 79%; m.p. 128.7-129.3 °C; IR (cm⁻¹): 3406 (NH), 3300 (NH), 3027, 2930, 2860, 1660 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H, H3), 7.80 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CONH), 7.69 (s, 1H, H6), 7.38 – 7.27 (m, 5H, ArH), 5.21 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.63 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.45 – 3.27 (m, 2H, CH₂), 1.71 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.35 (dp, *J* = 7.3, 4.7, 4.1 Hz, 4H, CH₂), 0.94 – 0.86 (m, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.14, 155.74, 143.07, 138.43, 133.18, 129.11, 128.60, 127.73, 127.32, 43.14, 41.54, 28.99, 28.94, 22.31, 13.92. Anal. Calcd. For C₁₇H₂₂N₄O (298.38): 68.43% C, 7.43% H, 18.78% N; Found: 68.40% C, 7.49% H, 18.71% N. MS (ESI, Pos.): m/z 299.11 (M+H)⁺. Log *k* = 0.638; CLog*P* = 4.582.

N-benzyl-5-hexylaminopyrazine-2-carboxamide (**2c**)

White solid. Yield: 75%; m.p. 117.7-118.3 °C; IR (cm⁻¹): 3400 (NH), 3303 (NH), 3064, 3027, 2955, 2928, 2866, 1660 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, H3), 7.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 7.69 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H6), 7.39 – 7.26 (m, 5H, ArH), 5.21 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 4.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.43 – 3.33 (m, 2H, CH₂), 1.69 – 1.54 (m, 2H, CH₂), 1.45 – 1.23 (m, 6H, CH₂), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.14, 155.75, 143.08, 138.44, 133.17, 129.12, 128.60, 127.74, 127.32, 43.14, 41.58, 31.42, 29.22, 26.54, 22.51, 13.96. Anal. Calcd. For C₁₈H₂₄N₄O (312.41): 69.20% C, 7.74% H, 17.93% N; Found: 69.24% C, 7.81% H, 17.85% N. MS (ESI, Pos.): m/z 313.14 (M+H)⁺. Log *k* = 0.859; CLog*P* = 5.111.

N-benzyl-5-heptylaminopyrazine-2-carboxamide (**2d**)

White solid. Yield: 65%; m.p. 95.8-96.1 °C; IR (cm⁻¹): 3388 (NH), 3329 (NH), 2929, 2858, 1641 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H, H3), 7.80 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CONH), 7.69 (s, 1H, H6), 7.37 – 7.27 (m, 5H, ArH), 5.19 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 4.63 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.43 – 3.34 (m, 2H, CH₂), 1.69 – 1.56 (m, 2H, CH₂), 1.44 – 1.19 (m, 8H, CH₂), 0.88 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.13, 155.74, 143.09, 138.44, 133.18, 129.09, 128.60, 127.74, 127.32, 43.14, 41.58, 31.67, 29.27, 28.91, 26.83, 22.52, 14.01. Anal. Calcd. For C₁₉H₂₆N₄O (326.44): 69.91% C, 8.03% H, 17.16% N; Found: 69.97% C, 8.07% H, 17.02% N. MS (ESI, Pos.): m/z 327.13 (M+H)⁺. Log *k* = 1.089; CLog*P* = 5.640.

N-benzyl-5-octylaminopyrazine-2-carboxamide (**2e**)

White solid. Yield: 80%; m.p. 97.0-97.9 °C; IR (cm⁻¹): 3389 (NH), 3317 (NH), 2919, 2855, 1660 (CO); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H, H3), 7.80 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CONH), 7.69 (s, 1H, H6), 7.36 – 7.26 (m, 5H, ArH), 5.16 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 4.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.38 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 1.70 – 1.53 (m, 2H, CH₂), 1.47 – 1.17 (m, 10H, CH₂), 0.87 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 164.14, 155.75, 143.11, 138.46, 133.22, 129.08, 128.61, 127.76, 127.33, 43.16,

41.60, 31.73, 29.28, 29.22, 29.15, 26.88, 22.59, 1405. Anal. Calcd. For C₂₀H₂₈N₄O (340.46): 70.56% C, 8.29% H, 16.46% N; Found: 70.47% C, 8.41% H, 16.41% N. MS (ESI, Pos.): m/z 341.15 (M+H)⁺. Log *k* = 1.312; CLog*P* = 6.169.

***N*-benzyl-3-chloropyrazine-2-carboxamide (3)**

Yellow solid. Yield: 80 %; m.p. 109.3–110.7 °C; IR (cm⁻¹): 3292 (NH), 1660 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 8.71 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5), 8.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 7.35 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, ArH), 7.32 – 7.21 (m, 3H, ArH), 4.49 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂Ar); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 164.09, 148.45, 145.80, 145.49, 142.94, 139.07, 128.82, 127.74, 127.46, 42.75. Anal. Calcd. For C₁₂H₁₀ClN₃O (247.68): 58.19% C, 4.07% H, 16.97% N; Found: 58.14% C, 4.10% H, 16.89% N. MS (ESI, pos.): m/z 247.95 (M+H)⁺. CLog*P* = 247.68.

***N*-benzyl-3-benzylaminopyrazine-2-carboxamide (3')**

Yellow solid. Identified side product of the reaction; m.p. 69.8–70.6 °C; IR (cm⁻¹): 3353 (NH), 3334 (NH), 3061, 3032, 1647 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 9.09 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, NH), 8.26 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H5), 7.81 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 7.38 – 7.16 (m, 10H, ArH, Ar'H), 4.63 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.44 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.27, 154.14, 146.58, 139.61, 139.56, 130.22, 128.61, 128.45, 127.54, 127.46, 127.45, 126.97, 126.65, 43.64, 42.36. Anal. Calcd. For C₁₉H₁₈N₄O (318.38): 71.68% C, 5.70% H, 17.60% N; Found: 71.73% C, 5.65% H, 17.68% N. MS not measured. Log *k* = 1.040; CLog*P* = 3.964.

***N*-benzyl-3-(butylamino)pyrazine-2-carboxamide (3a)**

Yellow liquid. Yield: 75 %; IR (cm⁻¹): 3324 (NH), 2957, 2929, 2871, 1653 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.35 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H5), 7.76 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 7.30 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ArH), 7.25 – 7.20 (m, 3H, ArH), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.41 – 3.34 (m, 2H, CH₂), 1.61 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.26 (m, 2H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.36, 154.42, 146.65, 139.59, 129.58, 128.44, 127.48, 126.94, 126.34, 42.31, 40.53, 31.07, 19.91, 13.88. MS (ESI, pos.): m/z 285.20 (M+H)⁺; C₁₆H₂₀N₄O (284.36). Log *k* = 1.081; CLog*P* = 4.103.

***N*-benzyl-3-(pentylamino)pyrazine-2-carboxamide (3b)**

Yellow liquid. Yield: 74 %; IR (cm⁻¹): 3322 (NH), 2956, 2929, 2859, 1653 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.34 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H5), 7.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 7.30 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ArH), 7.26 – 7.18 (m, 3H, ArH), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.42 – 3.34 (m, 2H, CH₂), 1.62 – 1.46 (m, 2H, CH₂), 1.35 – 1.23 (m, 4H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.35, 154.40, 146.64, 139.58, 129.57, 128.43, 127.48, 126.94, 126.34, 42.31, 40.53, 28.94, 28.64, 22.08, 14.10. MS (ESI, pos.): m/z 299.21 (M+H)⁺; C₁₇H₂₂N₄O (298.39). Log *k* = 1.321; CLog*P* = 4.632.

***N*-benzyl-3-(hexylamino)pyrazine-2-carboxamide (3c)**

Yellow liquid. Yield: 71 %; IR (cm⁻¹): 3322 (NH), 2955, 2928, 2857, 1654 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.34 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H5), 7.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H6), 7.30 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ArH), 7.25 – 7.19 (m, 3H, ArH), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.38 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂), 1.53 (p, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 1.39 – 1.19 (m, 6H, CH₂), 0.83 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.35, 154.41, 146.64, 139.58, 129.56, 128.42, 127.48, 126.93, 126.34, 42.31, 40.53, 31.18, 28.91, 26.40, 22.24, 14.09. MS (ESI, pos.): m/z 313.20 (M+H)⁺; C₁₈H₂₄N₄O (312.42). Log *k* = 1.564; CLog*P* = 5.161.

***N*-benzyl-3-(heptylamino)pyrazine-2-carboxamide (3d)**

Yellow liquid. Yield: 70 %; IR (cm⁻¹): 3320 (NH), 2955, 2926, 2855, 1653 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, CONH), 8.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H5), 7.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H6), 7.29 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, ArH), 7.25 – 7.18 (m, 3H, ArH), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.37 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂), 1.53 (p, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 1.36 – 1.16 (m, 8H, CH₂), 0.83 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.36, 154.41, 146.65, 139.59, 129.57, 128.43, 127.49, 126.94, 126.35, 42.31, 40.53, 31.41, 28.94, 28.62, 26.69, 22.23, 14.12. MS (ESI, pos.): m/z 327.24 (M+H)⁺; C₁₉H₂₆N₄O (326.44). Log *k* = 1.809; CLog*P* = 5.690.

***N*-benzyl-3-(octylamino)pyrazine-2-carboxamide (3e)**

Yellow liquid. Yield: 51 %; IR (cm⁻¹): 3309 (NH), 2970, 2926, 2855, 1653 (CO); ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.34 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CONH), 8.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H5), 7.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 7.30 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, ArH), 7.25 – 7.19 (m, 3H, ArH), 4.43 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂Ar), 3.37 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂), 1.53 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 1.38 – 1.12 (m, 10H, CH₂), 0.91 – 0.77 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 166.35, 154.41, 146.63, 139.58, 129.55, 128.42, 127.48, 126.93, 126.34, 42.31, 40.53, 31.41, 28.90, 28.82, 26.72, 22.26, 14.13. MS (ESI, pos.): m/z 341.23 (M+H)⁺; C₂₀H₂₈N₄O (340.47). Log *k* = 2.054; CLog*P* = 6.219.

HPLC lipophilicity determination - capacity factor *k* and calculated log *k*

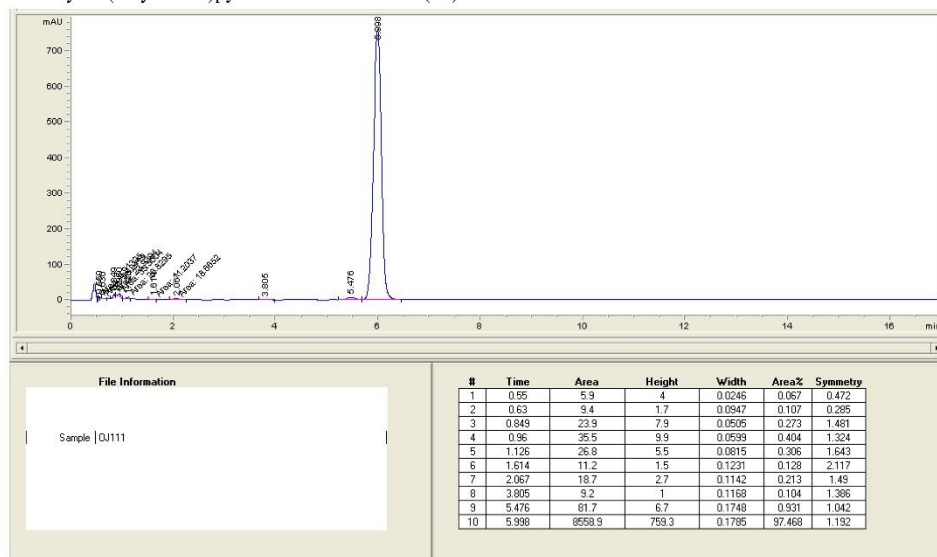
Agilent Technologies 1200 SL liquid chromatograph with Diode-array Detector SL G1315C, chromatographic column ZORBAX XDB-C18 RRHT 1.8 μm, 4.6 x 50 mm, Part No. 927975-902 (Agilent Technologies Inc., Colorado Springs, CO, USA) were used. The separation process was controlled by Agilent ChemStation, version B.04.02 extended by spectral module (Agilent Technologies Inc.). A solution of MeOH (HPLC grade, 70 %) with H₂O (HPLC-Milli-Q Grade, 30 %) was used as mobile phase. The total flow of mobile phase was 1.0 mL/min, injection 20 μL, column temperature 30 °C. 210 nm as detection wavelength and 270 nm as monitor wavelength were chosen. The KI methanol solution was used for the dead time (T_D) determination. Retention times (T_R) of synthesized compounds were measured in minutes. The capacity factors *k* were calculated using Microsoft Excel according to formula $k = (T_R - T_D)/T_D$, where T_R is the retention time of the solute and T_D denotes the dead time obtained via an unretained analyte. Log *k*, calculated from the capacity factor *k*, is used as the lipophilicity index converted to log *P* scale. Method was used for

compounds **1'**, **1a-e**, **2a-e**, **3'** and **3a-e** (measured in triplicates). Results were stated as average of $n = 3$ (SD values were negligible, relatively ranging from 0.01 to 0.19%).

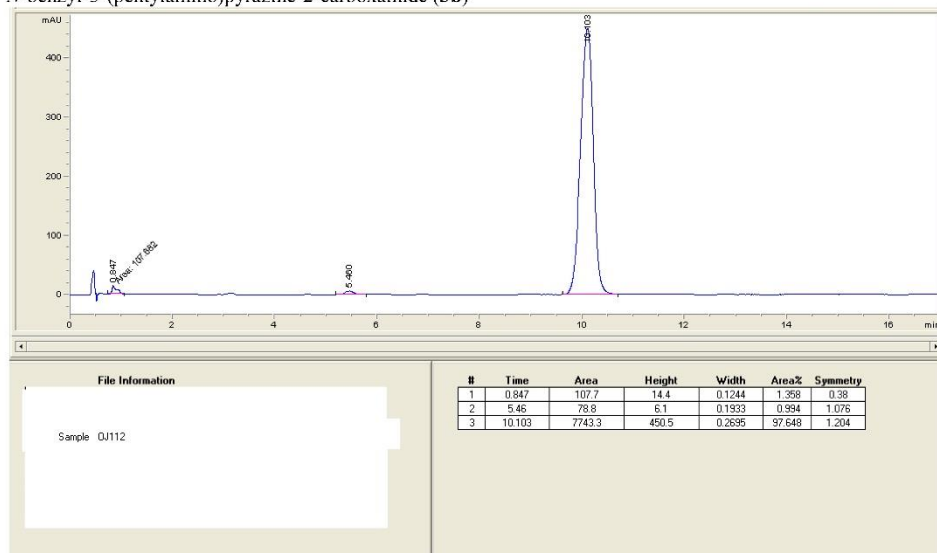
HPLC chromatograms of compounds **3a-3e**

Chromatograms of derivatives **3a-3e** are included. Main peak of corresponding compound represents area in the range from 96.8 % to 99.2 % of total peak areas. This can be taken as one of the purity criteria. System peaks, *i.e.* peaks found in the dead time (0.46 min) are not taken into account as the peaks do not represent any substances.

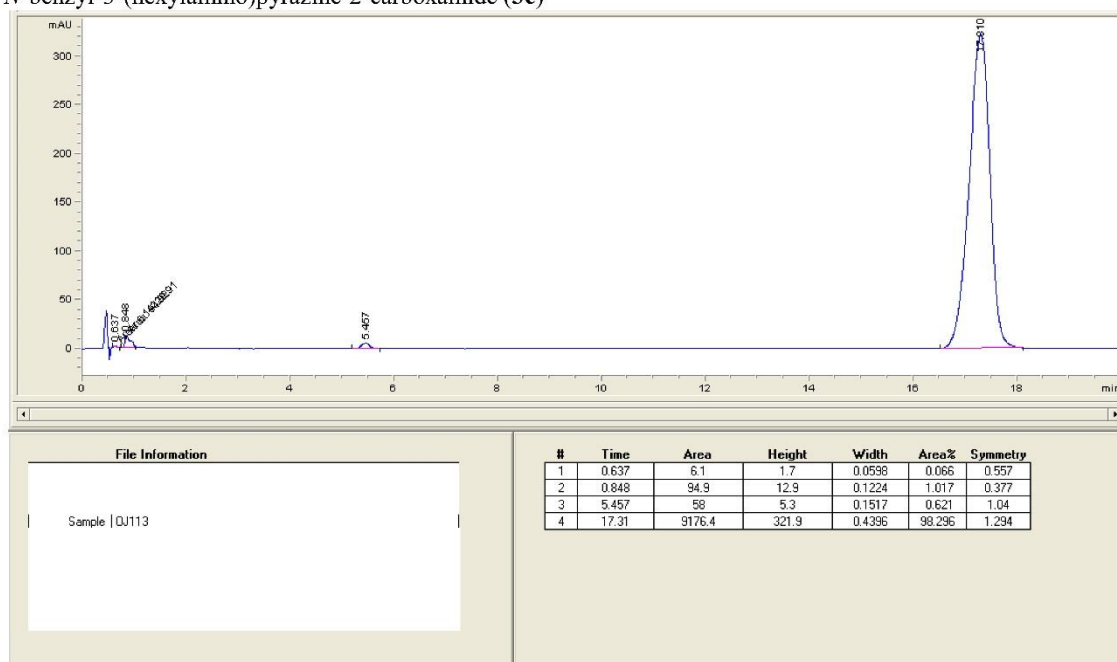
N-benzyl-3-(butylamino)pyrazine-2-carboxamide (**3a**)



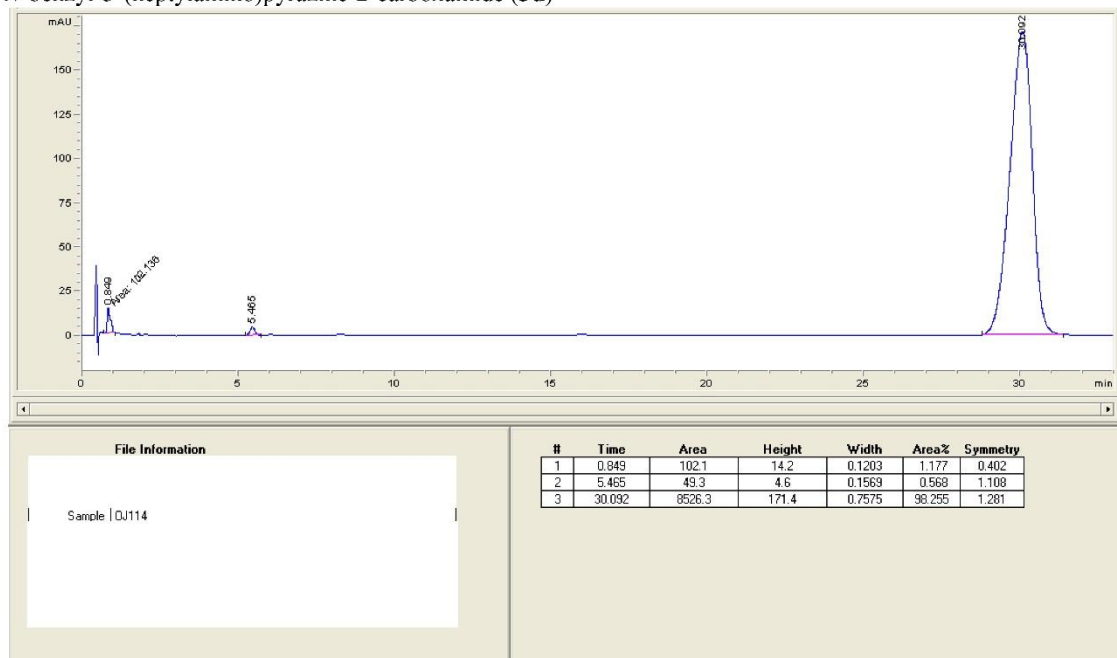
N-benzyl-3-(pentylamino)pyrazine-2-carboxamide (**3b**)



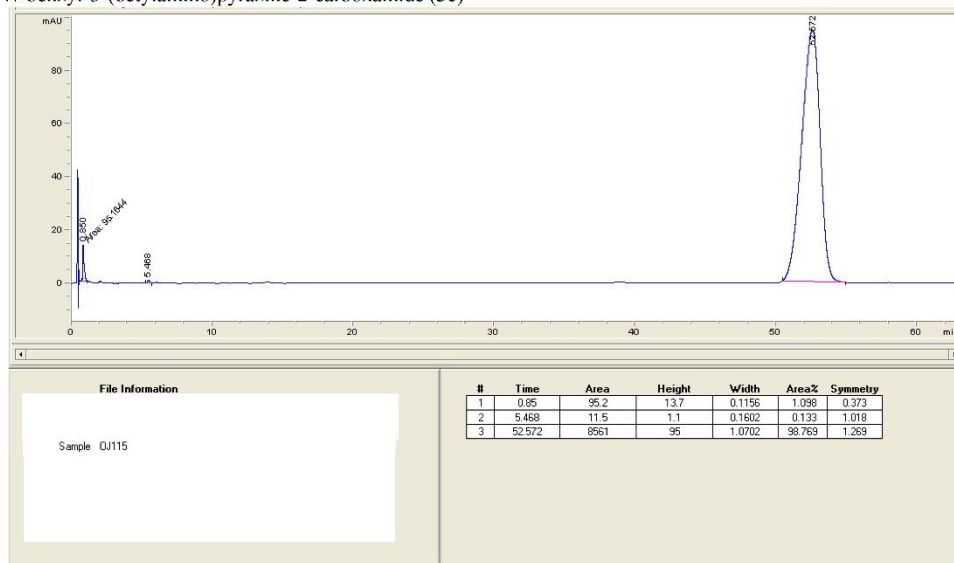
N-benzyl-3-(hexylamino)pyrazine-2-carboxamide (**3c**)



N-benzyl-3-(heptylamino)pyrazine-2-carboxamide (**3d**)



N-benzyl-3-(octylamino)pyrazine-2-carboxamide (**3e**)



Lipophilicity calculation and correlation between measured and calculated data.

$ClogP$ (the logarithm of n-octanol/water partition coefficient P based on established chemical interactions) values were calculated using the program CS ChemBioDraw Ultra ver. 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

The dependence of the calculated $ClogP$ values on the measured $\log k$ parameters showed a linearity within individual series of compounds (**Fig. 1**) and the corresponding correlations can be expressed by the following regression equations:

$$\mathbf{1a-e: } ClogP = 2.4012 \log k + 2.7381; R^2 = 1.0000; n = 5$$

$$\mathbf{2a-e: } ClogP = 2.3750 \log k + 3.0580; R^2 = 0.9998; n = 5$$

$$\mathbf{3a-e: } ClogP = 2.1733 \log k + 1.7580; R^2 = 1.0000; n = 5$$

As seen from **Fig. 1**, the $ClogP$ algorithm did not distinguish between corresponding 6-alkylamino (**1a-e**) and 5-alkylamino (**2a-e**) isomers. For example, the calculated lipophilicity $ClogP = 4.053$ was the same for both isomers **1a** and **2a**. $ClogP$ values predicted for 3-alkylamino isomers (**3a-e**) were insignificantly compared to corresponding 5-alkylamino and 6-alkylamino derivatives ($ClogP$ for **3a** was 4.103). On contrary, experimentally measured $\log k$ values indicate different lipophilicity for the positional isomers.

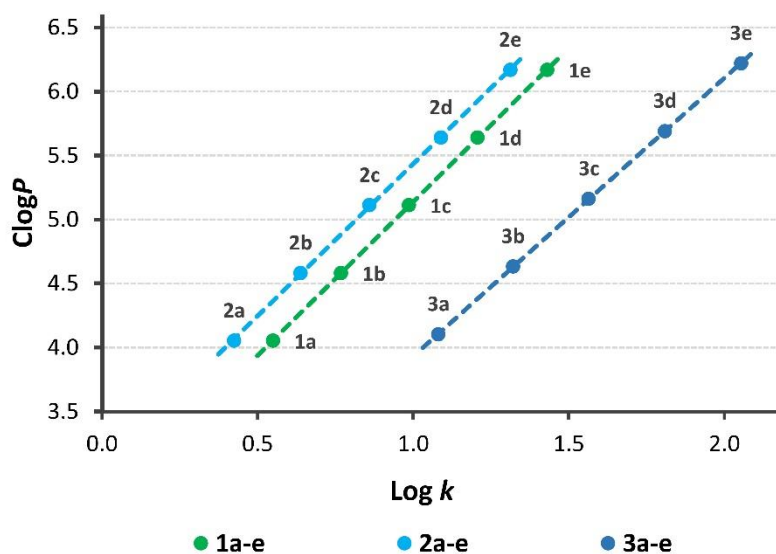


Fig. 1. Plot of calculated $ClogP$ values on experimentally determined $\log k$ parameters.

Strikingly, 3-alkylamino isomers (**3a-e**) are much lipophilic than predicted. This is probably due to the possibility of intramolecular *H*-bond formation as depicted for compound **3d** in **Fig. 2**. Consequently, it can be assumed that log *k* values specify lipophilicity of compounds more precisely than calculated Clog*P* values.

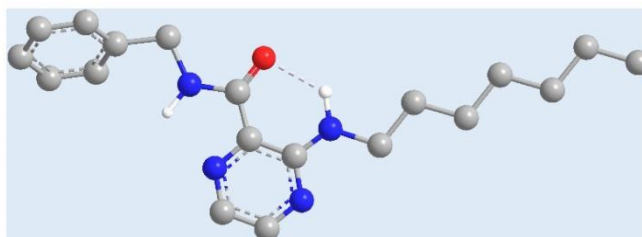


Fig. 2. Predicted conformation of **3d** as generated by CORINA 3D (available online at https://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo).

MS analysis of side-product *N*-benzyl-6-benzylaminopyrazine-2-carboxamide (**1'**)

The mass spectra were recorded in the mixture of MeOH, H₂O, formic acid (80:20:0.02 v/v) using LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The electrospray ionisation was performed in the positive mode. According to the fragment analysis, *N*-benzyl-6-benzylaminopyrazine-2-carboxamide was identified as a side-product, **Fig. 3**.

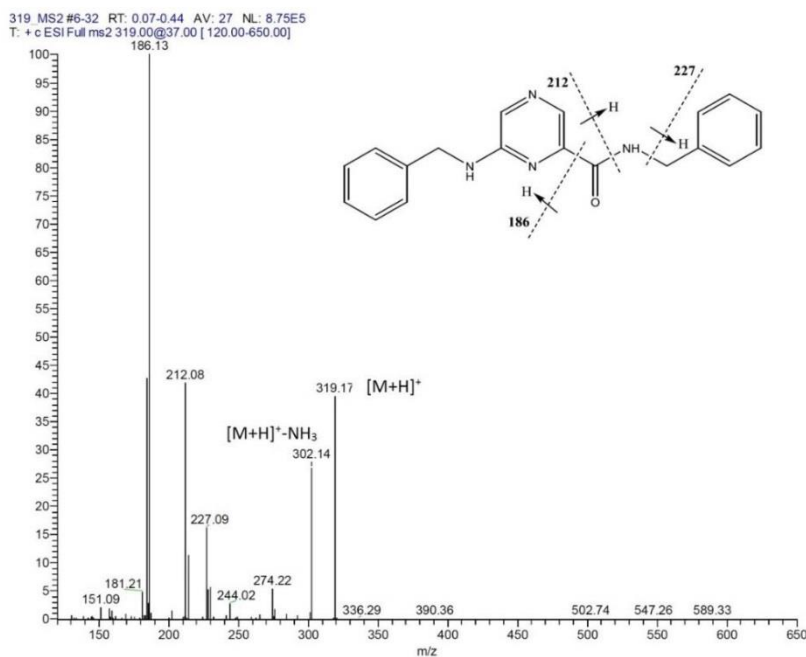


Fig. 3. Mass spectrum of side-product **1'** with labelled fragments.

In vitro antimycobacterial evaluation

Microplate alamar blue assay.⁸ Antimycobacterial evaluation was performed at the Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic. Four mycobacterial strains were used: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88, *M. avium* CNCTC My 80/72, *M. avium* CNCTC My 152/73 and *M. kansasii* CNCTC My 235/80 (Czech National Collection of Type Cultures, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic). The test compounds were dissolved in DMSO, diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) to final concentrations 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56 µg/mL and placed into microdilution panel. Tested species were added in the form of suspension in isotonic saline solution. The final concentration of DMSO was 0.5 % (v/v); this concentration of DMSO did not affect the growth of mycobacteria. The cultures were grown in Šula's semisynthetic medium at pH 5.6 and 37 °C. 30 µL of working solution (1:1 mixture of 0.1% resazurin sodium salt (aq. sol.) and 10% Tween 80) was used for visualization of growth. The working solution was usually added after 5 days of incubation for *M. avium*, after 5-7 days for

M. kansasii and 10-14 days for *M. tuberculosis*. Results were then determined after 24 h and interpreted according to Framzblau *et al.*⁸ The minimal inhibition concentration (MIC, µg/mL) was determined as the lowest concentration which prevented a colour change from blue to pink.

Resistant strains: clinically isolated *M. tuberculosis* 234/2005, *M. tuberculosis* 9449/2007, *M. tuberculosis* 7357/1998, *M. tuberculosis* 8666/2010, *M. tuberculosis* Praha 1, *M. tuberculosis* Praha 4 and *M. tuberculosis* Praha 131. Microplate dilution method. Tested compounds were dissolved in DMSO, diluted with Šula's semisynthetic medium (Trios, Prague, Czech Republic) to final concentrations from 1 to 1000 µM. INH was used as a standard in a sterile water solution at a concentration range from 0.5 to 250 µM. Suspensions of the mycobacterial strains were adjusted to density of 1.0 on McFarland standard. MIC was determined as the lowest concentration which inhibited the visual growth after incubation at 37 °C for 14/21 days.

Examples of correlation between antimycobacterial activity (selected strains) and lipophilicity $\log k$ are presented in **Fig. 4** (for compounds **1a-e**) and **Fig. 5** (for compounds **2a-e**). A similar type of correlation was observed of all tested strains – activity culminates in compounds with hexyl- to octylamino substitution (labelled **c-e**).

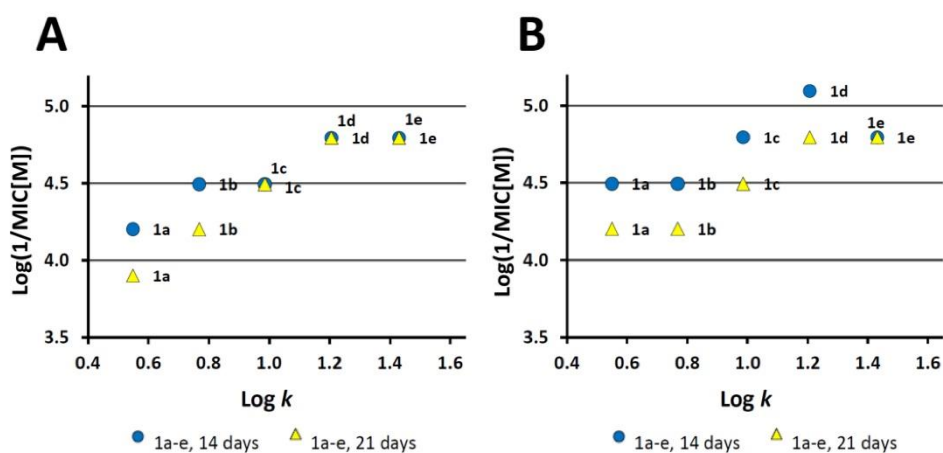


Fig. 4. Correlation between antimycobacterial activity and lipophilicity ($\text{Log } k$) for compounds **1a-e**. **A:** Multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* 234/2005; **B:** Multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* 8666/2010.

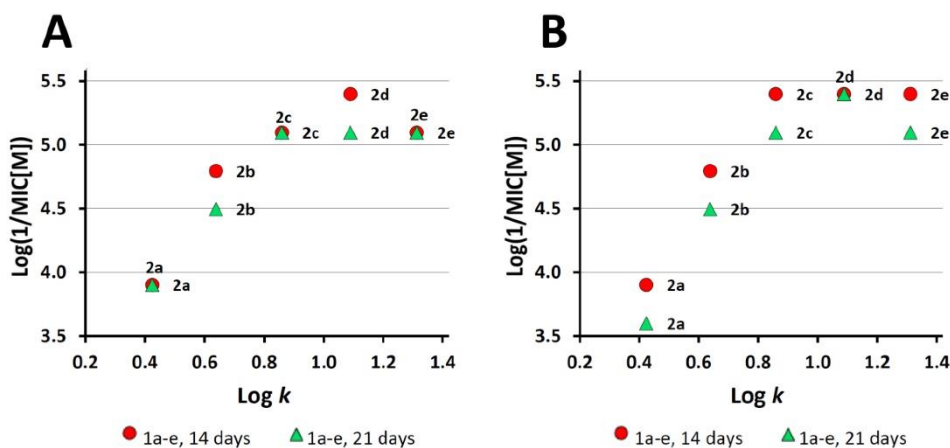


Fig. 5. Correlation between antimycobacterial activity and lipophilicity ($\text{Log } k$) for compounds **2a-e**. **A:** Multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* 9449/2007; **B:** Multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis* Praha 1.

In vitro antibacterial evaluation

Microdilution broth method.⁹ The organisms examined included strains from Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961. These strains are recommended as standards for testing of antibacterial activities. Other strains were clinical isolates (Department of Clinical Microbiology, University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic):

Staphylococcus aureus H 5996/08-methicilin resistant (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08-ESBL positive. All strains were subcultured on Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) at 35 °C. Bacterial inocula were prepared by suspending in sterile 0.85% saline. The cell density of the inoculum was adjusted to yield suspension of density equivalent 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 viable CFU/mL). The compounds were dissolved in DMSO, and the antibacterial activity was determined in Mueller-Hinton liquid broth (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI), buffered to pH 7.0. Controls consisted of medium and DMSO alone. The final concentration of DMSO in the test medium did not exceed 1% (v/v) of the total solution composition. The minimum inhibitory concentration (MIC), defined as 95% inhibition of bacterial growth as compared to control, was determined after 24 and 48 h of static incubation at 35 °C.

Table 1.
Antibacterial activity of the most active derivatives, MIC values defined as 95% inhibition of bacterial growth.

No.	MIC (µM)					
	SA		MRSA		SE	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1a	62.5	62.5	>500	>500	250	>500
1b	125	>500	125	>500	125	>500
1c	31.3	500	31.3	500	31.3	500
1d	500	>500	250	>500	500	>500
1e	3.9	3.9	31.3	500	62.5	>500
Neomycin	1.95	3.9	3.9	7.81	15.6	15.6
Bacitracin	7.81	7.81	7.81	31.3	15.6	31.3
Penicillin G	0.49	0.98	62.5	125	125	250

SA = *Staphylococcus aureus*
MRSA = methicillin-resistant *S. aureus*
SE = *S. epidermidis*

In vitro antifungal evaluation

The Department of Medical and Biological Sciences at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Czech Republic, performed the antifungal susceptibility assays, which was carried out using microdilution broth method. (National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Method for Antifungal Disc Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline M44-A; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2004.) Compounds were dissolved in DMSO and diluted in a twofold manner with RPMI 1640 medium with glutamine buffered to pH 7.0 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid). The final concentration of DMSO in the tested medium did not exceed 2.5 % (v/v) of the total solution composition. Static incubation was performed in the dark and humid, at 35 °C for 24 and 48 h (respectively 72 and 120 h for *Trichophyton mentagrophytes*). Drug-free controls were included. Fluconazole was used as standard. Tested species: *Candida albicans* ATCC 44859, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* F28, *C. glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Aspergillus fumigates* 231, *Lichtheimia corymbifera* 272 and *Trichophyton mentagrophytes* 445.

Cytotoxicity measurement

Cytotoxicity was investigated on Crandell feline kidney (CrFK) cells, human embryonic lung (HEL) fibroblasts, human cervix epithelial (HeLa) and African green monkey kidney (Vero) cells, according to published procedures.¹⁰⁻¹² Briefly, the cells were seeded in 96-well plates and allowed to reach subconfluency. After addition of the test compounds at serial dilutions, the cultures were incubated at 37°C during 4-6 days. Then, the compounds' cytotoxicity was determined by microscopy and expressed as the minimal cytotoxic concentration (MCC) or compound concentration producing minimal changes in cell morphology, or by performing the formazan-based MTS cell viability assay, yielding the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀)¹¹⁻¹².

Antiviral evaluation

Antiviral activity in cell culture was assessed by cytopathic effect (CPE) reduction assays with a broad panel of viruses¹⁰⁻¹². The following viruses were examined on human embryonic lung fibroblast cells: herpes simplex virus type 1 (HISV-1); a thymidine kinase-deficient (TK-) HISV-1 KOS strain resistant to acyclovir; herpes simplex virus type 2 (HISV-2); vaccinia virus; human adenovirus type 2; and vesicular stomatitis virus (VSV). The viruses examined on human cervix carcinoma HeLa cells were: VSV; Coxsackie B4 virus; and respiratory syncytial virus (RSV). African Green Monkey Vero cells were used to determine the antiviral effect on para-influenza-3 virus; reovirus-1; Sindbis virus; Coxsackie B4 virus and Punta Toro virus. Human influenza A/H1N1, A/H3N2 and B viruses were assessed on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Finally, activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and type 2 was studied in human MT-4 lymphoblast cells. To perform the tests, the virus was added to semiconfluent cell cultures in 96-well plates and, simultaneously, serial dilutions of the test compounds were added. The plates were incubated until clear CPE was reached (typically 3-6 days). Microscopic scoring was then performed to determine the

antiviral activity [expressed as 50% effective concentration (EC₅₀)]. In the case of HIV-1, HIV-2 and influenza virus, virus-induced CPE was determined by the colorimetric formazan-based MTS cell viability assay.

Effect on mycolic acid synthesis

The strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (OD₆₀₀ = 0.185) was grown in the presence of compounds **1d** and **2e** (5 µg/mL) or isoniazid (5 µg/mL) at 37°C for 20 h and then [1,2-¹⁴C] acetate (0.5 µCi/mL, specific activity 106 mCi/mmol, Amersham Radiolabeled Chemicals) was added followed by further 24 h cultivation. The cells were harvested and excessively washed with physiological saline solution. Mycolic acid methyl esters were prepared as described previously.¹³ Briefly, 1 mL of 15% tetrabutylammonium hydroxide (Sigma-Aldrich) was added to cell pellets and the samples were saponified at 100 °C overnight. Fatty/mycolic acids were subsequently methylated by adding 1.5 mL of dichloromethane, 150 µL of iodomethane and 1 mL of dd H₂O for 4 h at room temperature with mixing. After centrifugation, the upper layer was discarded and the lower organic phase was washed twice with dd H₂O, dried under nitrogen and extracted by 2 mL of diethyl ether. After bath sonication and centrifugation at 1 000 x g diethyl ether extract was transferred to a new glass tube, dried under nitrogen and dissolved in 200 µL of CHCl₃/CH₂OH (2:1, v/v). ¹⁴C labelled FAME/MAME were analyzed by TLC. For each sample 10 000 dpm were loaded on Silica Gel 60-precoated F₂₅₄ plates and developed in n-hexane/ethyl acetate (95:5, v/v, 3 x). The FAME/MAME were visualized by exposure of TLC plates to Kodax Biomax MR films for 5 days at -70°C.

Docking procedure

All molecular modelling was done using Schrödinger Suite (Release 2014-2) and visualizations were prepared in Maestro 9.8 (Schrödinger, Inc.). Ligands were drawn manually in Maestro, converted to 3D and prepared as ligands using LigPrep (energy minimization using OPLS_2005 force field, generation of possible states at pH 7.0 ± 2.0, without generation of tautomers). Target protein was downloaded from PDB databank (pdb: 2X23) and prepared using Maestro Protein Preparation Wizard with default settings and as follows. Ionisation states of protein residues and cofactor NAD⁺ were calculated by PROPKA with default settings (pH = 7.0 ± 3.0). Water molecules were removed with the exception of HOH2009, HOH2112 and HOH2171, which mediate the interaction of NAD⁺ with protein. Grid box for docking box was centered on the co-crystallized inhibitor and had outer size of 22 Å to easily accommodate even large octylamino derivatives. The docking was performed using Glide in XP (extra precision) mode with flexible sampling of ligands and without any constraints. Hydroxyl of Phe158 and 2'-OH of the ribose of NAD⁺ were treated as rotatable.

Table 2.

Best XP GScore values for compounds **1c-e**, **2c-e** and **3c-e** docked into the active site of mycobacterial enoyl-ACP-reductase (InhA, pdb: 2X23) in comparison with co-crystallized ligand **PT70**.

Compound	PT70	1c	1d	1e	2c	2d	2e	3c	3d	3e
XP GScore	-10.543	-8.752	-8.566	-9.705	-9.048	-9.208	-8.330	-3.692	-5.545	-6.175

References:

- Servusová, B.; Eibinova, D.; Dolezal, M.; Kubicek, V.; Paterova, P.; Pesko, M.; Kralova, K. Substituted *N*-benzylpyrazine-2-carboxamides: Synthesis and biological evaluation. *Molecules*. **2012**, *17*, 13183.
- Abe, Y.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F.; Okada, S.; Ozasayma, E. Methyl 6-methoxy-pyrazine-2-carboxylate. JP Patent 44012898, 1969; *Chem. Abstr.* **1969**, *71*, 112979y.
- Matulenko, M.A.; Lee, C.H.; Jiang, M.; Frey, R.R.; Cowart, M.D.; Bayburt, E.K.; DiDomenico, S. 5-(3-Bromophenyl)-7-(6-morpholin-4-ylpyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-4-ylamine: Structure-activity relationships of 7-substituted heteroaryl analogs as non-nucleoside adenosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3705.
- Clayden, J. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2008; 276–296.
- Erickson, A. E.; Spoerri, P. E. Syntheses in the Pyrazine Series. The preparation and properties of the pyrazyl halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 400.
- Allen, J. R., et al. Nitrogen-heterocyclic compounds as phosphodiesterase 10 inhibitors. *PCT Int. Appl.* **2011**, 143129.
- Jandourek, O.; Dolezal, M.; Kunes, J.; Kubicek, V.; Paterova, P.; Pesko, M.; Buchta, V.; Kralova, K.; Zitko, J. New potentially active pyrazinamide derivatives synthesized under microwave conditions. *Molecules*. **2014**, *19*, 9318.
- Franzblau, S.G.; Witzig, R.S.; McLaughlin, J.C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernandez, A.; Degnan, M.T.; Cook, M.B.; Quenzer, V.K.; Ferguson, R.M.; Gilman, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 362.
- Jones, R.N.; Barry, A.L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *J. Clin. Microbiol.* **1987**, *25*, 1920.
- Naesens, L.; Stephens, C.E.; Andrei, G.; Loregian, A.; De Bolle, L.; Snoeck, R.; Sowell, J.W.; De Clercq, E. Antiviral properties of new arylsulfone derivatives with activity against human betaherpesviruses. *Antiviral Res.* **2006**, *72*, 60.

11. Naesens, L.; Vanderlinden, E.; Roth, E.; Jeko, J.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Pannecouque, C.; Illyes, E.; Batta, G.; Herezegh, P.; Sztaricskai, F. Anti-influenza virus activity and structure-activity relationship of aglycoristocetin derivatives with cyclobutenedione carrying hydrophobic chains. *Antiviral Res.* **2009**, *82*, 89.
12. Vanderlinden, E.; Göktas, F.; Cesur, Z.; Froeyen, M.; Reed, M. L.; Russell, C. J.; Cesur, N.; Naesens, L. Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4277.
13. Phetsuksiri, B., A. R. Baulard, A. Cooper, D. E. Minnikin, J. D. Douglas, G. S. Besra, and P. J. Brennan. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1042.

PŘÍLOHA P7

VANASKOVA, B. Syntéza a biologické hodnocení cykloalkylamino derivátů *N*-fenzylpyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu. Metodika hodnocení inhibice syntézy TDM, TMM a PIMs. Nепublikovaná data. **2015.**

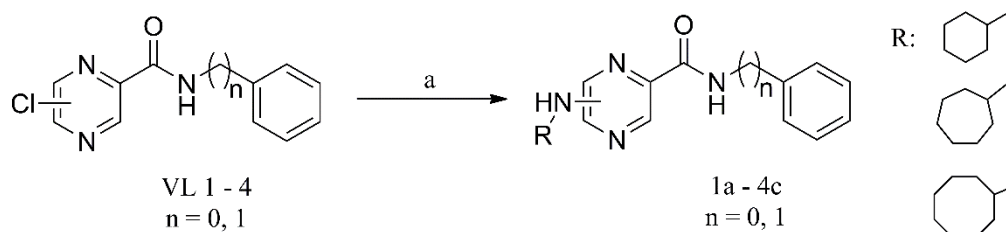
Syntéza a biologické hodnocení cykloalkylamino derivátů odvozených od *N*-fenylpyrazin-2-karboxamidu a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu.

Metodika hodnocení inhibice syntézy TDM, TMM a PIMs.

Tato příloha obsahuje podrobnosti týkající se syntézy cykloalkylamino derivátů *N*-fenyl a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu, použitých metod a přístrojového vybavení. Dále jsou zde uvedena analytická data připravených sloučenin, výsledky hodnocení antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální aktivity a cytotoxicity. V rámci této přílohy je popsána i metodika hodnocení inhibice syntézy některých esenciálních složek mykobakteriální buněčné stěny.

Bylo připraveno 12 nových v literatuře nepopsaných sloučenin odvozených od *N*-fenyl a *N*-benzylpyrazin-2-karboxamidu.

Schéma 10: Příprava finálních sloučenin 1a – 4c.



a) cykloalkylamin, TEA, EtOH, reflux, 3 – 6 hod.

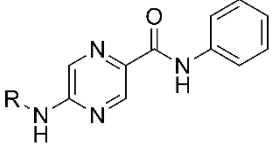
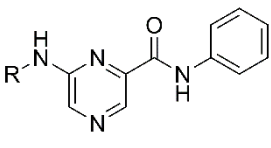
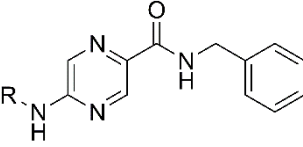
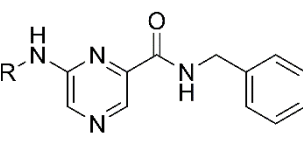
VÝSLEDKY BIOLOGICKÉHO TESTOVÁNÍ

Antimykobakteriální aktivita

Přehled antimykobakteriální aktivity připravených látek viz **Tabulka 1**. Substituce chloru za cykloalkylamino skupinu vede v případě derivátů substituovaných do polohy 5 k poklesu či ztrátě aktivity vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve srovnání s výchozími látkami **VL 1** a **VL 3** (s výjimkou látky **1b** – aktivita zachována). V případě 6-isomerů byla aktivita zachována (**4a – 4c**) či došlo k mírnému zvýšení aktivity (**2a – 2c**) ve srovnání s výchozími látkami **VL 2** a **VL 4**, u těchto derivátů byl navíc pozorován nárůst aktivity vůči *Mycobacterium kansasii* (MIC = 12,5 µg/ml). Ve srovnání s použitými standardy vykazaly nejúčinnější deriváty aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv převyšující aktivitu PZA (MIC = 12,5 µg/ml), respektive aktivitu vůči *Mycobacterium kansasii* srovnatelnou s INH (MIC = 6,25 µg/ml).

S výjimkou látky **2b** (aktivita vůči *Mycobacterium avium* 152/73) nebyla pozorována aktivita vůči testovaným kmenům *Mycobacterium avium*.

Tabulka 13: Přehled připravených sloučenin a výsledky antimykobakteriální aktivity vyjádřené pomocí MIC (µg/ml).

	Kód	R	<i>M. tuberculosis</i> ^a	<i>M. kansasii</i> ^b	<i>M. avium</i> ^c
	1a	-C ₆ H ₁₁	6.25	6.25	>100
	1b	-C ₇ H ₁₃	1.56	>100	>100
	1c	-C ₈ H ₁₅	>100	>100	>100
VL 1			1,56 – 3,13	25	>100
	2a	-C ₆ H ₁₁	12.5/25*	12.5	>100
	2b	-C ₇ H ₁₃	12.5	12.5	12.5
	2c	-C ₈ H ₁₅	3.13	12.5	n. d.
VL 2			25	>100	>100
	3a	-C ₆ H ₁₁	>100	>100	>100
	3b	-C ₇ H ₁₃	100	>100	>100
	3c	-C ₈ H ₁₅	>100	>100	>100
VL 3			25	100	>100
	4a	-C ₆ H ₁₁	12.5	12.5	n. d.
	4b	-C ₇ H ₁₃	12.5	12.5	n. d.
	4c	-C ₈ H ₁₅	12.5	>100	n. d.
VL 4			12,5	100	>100
PZA			12,5	>100	>100
INH			0.2	6.25	6.25

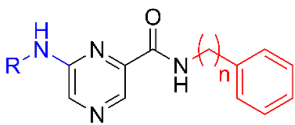
^a H37Rv CNCTC My 331/88; ^b CNCTC My 235/80; ^c CNCTC My 152/73. n. d. = není dostupné. PZA = pyrazinamid; INH = isoniazid.

Antibakteriální aktivity

Žádný z připravených derivátů nevykázal aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím. V případě antifungální aktivity byla u části látek pozorována pouze zanedbatelná aktivita vůči *Trichophyton mentagrophytes* 445 (MIC ≥ 125 µmol/l).

6-Cykloheptylamino a 6-cyklooktylamino deriváty vykázaly aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím – *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 (SA), meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus* H5996/08 (MRSA) a *Staphylococcus epidermidis* H6966/08 (SE). V případě derivátů odvozených od *N*-fenylypyrazin-2-karboxamidu byla aktivita srovnatelnou či převyšující aktivitu použitých standardů, viz **Tabulka 2**.

Tabulka 14: Přehled derivátů s antibakteriální aktivitou.

Struktura	Kód	n	R	MIC (μmol/l)					
				SA		MRSA		Se	
				24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
	2b	0	-C₇H₁₃	7,81	7,81	7,81	7,81	3,9	3,9
	2c	0	-C₈H₁₅	1,95	1,95	7,81	7,81	0,98	0,98
	4b	1	-C₇H₁₃	62,5	62,5	>500	>500	31,25	31,25
	4c	1	-C₈H₁₅	15,62	15,62	500	500	250	250
			Pen	0,49	0,98	62,5	125	125	250
			Cip	0,24	0,49	250	500	250	250
			Bac	7,81	7,81	7,81	31,25	15,62	31,25
			Neom	1,95	3,9	3,9	7,81	15,62	15,62

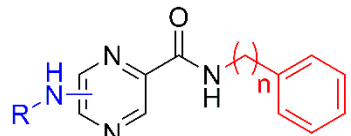
Pen = penicilin G, Cip = ciprofloxacin, Bac = bacitracin, Neom = neomycin sulfát.

Cytotoxicita

Výsledky testování cytotoxicity na HepG2 buňkách byly vyjádřeny pomocí inhibičních koncentrací IC₅₀, testovány byly především deriváty se slibnou antimykobakteriální aktivitou. V důsledku nízké rozpustnosti látky **1a** v testovacím médiu nebylo možné určit přesnou hodnotu IC₅₀, nicméně ani při maximální koncentraci dosažené při ředění látky nebyl pozorován cytotoxický efekt na HepG2 buňky. Na základě trendu inhibiční křivky byla pro látku **1a** vypočítána hodnota IC₅₀ (údaj uvedený v závorce, viz **Tabulka 3**). Index selektivity byl vypočítán s využitím hodnot MIC vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (v μmol/l).

Z testovaných látek vykázala nízkou cytotoxicitu na HepG2 (IC₅₀ = 48,7 μmol/l, SI = 9,7) a slibnou antimykobakteriální aktivitu pouze sloučenina **1b**, tj. 6-cykloheptylamino-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamid. 6-Cykloalkylamino deriváty byly poměrně toxické vůči HepG2 buňkám.

Tabulka 15: Přehled cytotoxicity vybraných cykloalkylamino derivátů na HepG2 buňky.

Struktura	Kód	n	R	IC ₅₀ (μmol/l)	SI*
	1a	0	5-C₆H₁₁	>100 (121,2)	>4,7 (5,7)
	1b	0	5-C₇H₁₃	48,7	9,7
	2b	0	6-C₇H₁₃	19,3	0,5
	2c	0	6-C₈H₁₅	18,5	2,0
	4a	1	6-C₆H₉	102,0	2,5

* Hodnoty SI vypočítané pro *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (IC₅₀/MIC v μmol/l).

METODICKÁ ČÁST

Syntéza

Výchozí látky 1 - 4 (**VL 1 - 4**) i finální produkty **1a - 4c** byly připraveny dle postupů uvedených v přílohách **P1, P2, P5 a P6**.

Vlastní syntéza cykloalkylamino derivátů probíhala následovně: Odpovídající výchozí látka (0,5 mmol) byla rozpuštěna v EtOH. Do roztoku byl přidán příslušný cykloalkylamin (2 ekvivalenty, tj. 1 mmol) a TEA (1 ekvivalent, tj. 0,5 mmol). Poté byla směs zahřívána k varu po dobu 3 až 6 hod. Po evaporaci rozpouštědla byl přebytek cykloalkylaminu odstraněn vytřepáním do vody okyselené 35% HCl. Organická fáze (CH₂Cl₂) byla následně vysušena bezvodým síranem sodným, adsorbována na silikagel a přečištěna pomocí flash chromatografie. Finální produkty byly v případě potřeby rekrystalizovány z ethanolu s přidavkem aktivního uhlí.

Obecné postupy a přístrojové vybavení

Experimentální podmínky a přístrojové vybavení jsou shodné s uvedenými v příloze **P5**.

Analytická data připravených sloučenin

5-Cyklohexylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (1a). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 55,2 %. $T_f = 145,1-146,0$ °C. IR (cm⁻¹, ATR-Ge) 3291, 2936, 2853, 1660. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.05 (s, 1H, CONH), 8.63 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 3H), 7.95 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 6H), 7.86 – 7.82 (m, 2H, ArH), 7.75 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.31 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 2H, ArH), 7.06 (tt, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, ArH), 3.91 – 3.67 (m, 1H, CH), 2.00 – 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.79 – 1.65 (m, 2H, CH₂), 1.63 – 1.51 (m, 1H, CH₂), 1.45 – 1.04 (m, 5H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.54, 155.54, 143.12, 138.93, 131.71, 131.43, 128.72, 123.47, 120.07, 48.95, 32.21, 25.44, 24.58. Vypočítáno pro C₁₇H₂₀N₄O (296.37): C, 68.90; H, 6.80; N, 18.90; a nalezeno: C, 68.79; H, 6.83; N, 19.01. Log P: 2.35, CLogP: 4.318.

5-Cykloheptylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (1b). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 60,2 %. $T_f = 147.9-148.5$ °C. IR (cm⁻¹, ATR-Ge) 3255, 2928, 2856, 1671. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.05 (s, 1H, CONH), 8.63 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 3H), 7.94 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 6H), 7.86 – 7.82 (m, 2H, ArH), 7.78 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.31 (dd, $J = 8.6, 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, ArH), 4.05 – 3.94 (m, 1H, CH), 1.96 – 1.86 (m, 2H, CH₂), 1.69 – 1.39 (m, 10H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.57, 155.32, 143.14, 138.94, 131.63, 131.51, 128.72, 123.47, 120.07, 51.01, 34.02, 28.06, 23.74. Vypočítáno pro C₁₈H₂₂N₄O (310.40): C, 69.65; H, 7.14; N, 18.05; a nalezeno: C, 69.72; H, 7.18; N, 18.00. Log P: 2.77, CLogP: 4.877.

5-Cyklooktylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (1c). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 61,2 %. $T_f = 134.9-136.2$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3291, 2920, 2854, 1661. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.05 (s, 1H, CONH), 8.63 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 3H), 7.95 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 6H), 7.84 (m, 2H, ArH), 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.31 (dd, $J = 8.5, 7.2$ Hz, 2H, ArH), 7.08 – 7.04 (m, 1H, ArH), 4.09 – 4.00 (m, 1H, CH), 1.86 – 1.77 (m, 2H, CH_2), 1.75 – 1.43 (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.56, 155.32, 143.15, 138.94, 131.59, 131.56, 128.71, 123.46, 120.06, 50.01, 30.97, 27.14, 25.17, 23.33. Vypočítáno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ (324.43): C, 70.34; H, 7.46; N, 17.27; a nalezeno: C, 70.27; H, 7.57; N, 17.26. Log P: 3.18, CLogP: 5.436.

6-Cyclohexylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (1a). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 58,1 %. $T_f = 138.4-139.7$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3319, 2938, 2853, 1671. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.59 (bs, 1H, CONH), 8.68 (s, 1H, 3H), 8.05 (s, 1H, 5H), 7.76 – 7.67 (m, 2H, ArH), 7.39 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 2H, ArH), 7.20 – 7.13 (m, 1H, ArH), 4.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 3.81 – 3.72 (m, 1H, CH), 2.17 – 2.09 (m, 2H, CH_2), 1.85 (m, 2H, CH_2), 1.73 (m, 1H, CH_2), 1.54 – 1.42 (m, 2H, CH_2), 1.38 – 1.25 (m, 3H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 161.64, 151.79, 141.13, 137.50, 135.55, 131.53, 129.10, 124.41, 119.53, 50.23, 32.86, 25.60, 24.79. Vypočítáno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$ (296.37): C, 68.90; H, 6.80; N, 18.90; a nalezeno: C, 68.97; H, 6.67; N, 18.84. Log P: 2.35, CLogP: 4.318.

6-Cykloheptylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (2b). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 53,9 %. $T_f = 106.4-107.3$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3330, 2932, 2851, 1682. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 10.01 (s, 1H, CONH), 8.26 (s, 1H, 3H), 8.12 (s, 1H, 5H), 7.86 – 7.69 (m, 2H, ArH), 7.42 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.39 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 2H, ArH), 7.16 – 7.11 (m, 1H, ArH), 4.20 – 4.12 (m, 1H, CH), 1.95 (m, 2H, CH_2), 1.73 – 1.48 (m, 10H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 162.42, 152.63, 141.42, 138.08, 137.10, 129.01, 124.26, 120.14, 109.70, 50.61, 33.88, 28.15, 24.02. Vypočítáno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ (310.40): C, 69.65; H, 7.14; N, 18.05; a nalezeno: C, 69.72; H, 7.10; N, 18.13. Log P: 2.77, CLogP: 4.877.

6-Cyklooktylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid (2c). Bílá krystalická látka. Výtěžek: 65.8 %. $T_f = 101.6-102.9$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3284, 2926, 2861, 1655. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.63 (bs, 1H, CONH), 8.66 (s, 1H, 3H), 8.04 (s, 1H, 5H), 7.74 – 7.69 (m, 2H, ArH), 7.41 – 7.35 (m, 2H, ArH), 7.18 – 7.12 (m, 1H, ArH), 4.97 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 4.07 – 3.98 (m, 1H, CH), 2.02 – 1.92 (m, 4H, CH_2), 1.87 – 1.55 (m, 10H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 161.71, 151.67, 141.11, 137.54, 136.07, 131.22, 129.10, 124.38, 119.46, 51.03, 32.54, 26.91, 26.01, 24.13. Anal. Calcd. For $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ (324.43) C, 70.34; H, 7.46; N, 17.27; O, 4.93; a nalezeno: C, 70.41; H, 7.49; N, 17.21. Log P: 3.18, CLogP: 5.436.

***N*-Benzyl-5-cyklohexylaminopyrazin-2-karboxamid (3a).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 80,4 %. $T_f = 217.3-218.9$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3288, 2923, 2852, 1656. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.76 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CONH), 8.51 (s, 1H, 3H), 7.86 (s, 1H, 6H), 7.59 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.29 (m, 4H, ArH), 7.21 (m, 1H, ArH), 4.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.77 (dt, $J = 7.1, 3.4$ Hz, 1H, CH), 1.89 (m, 2H, CH_2), 1.73 – 1.65 (m, 2H, CH_2), 1.64 – 1.47 (m, 1H, CH_2), 1.40 – 1.05 (m, 5H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 163.96, 155.47, 142.32, 140.08, 132.01, 131.48, 128.35, 127.45, 126.79, 48.85, 42.18, 32.24, 25.47, 24.60. Vypočítáno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ (310.40): C, 69.65; H, 7.14; N, 18.05; a nalezeno: C, 69.76; H, 7.23; N, 17.95. Log P: 2.42, CLogP: 4.497.

***N*-Benzyl-5-cykloheptylaminopyrazin-2-karboxamid (3b).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 63,8 %. $T_f = 201.9-202.5$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3296, 2926, 2855, 1656. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.77 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CONH), 8.52 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, 3H), 7.86 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, 6H), 7.63 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 7.34 – 7.25 (m, 4H, ArH), 7.24 – 7.17 (m, 1H, ArH), 4.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.01 – 3.91 (m, 1H, CH), 1.94 – 1.83 (m, 2H, CH_2), 1.66 – 1.38 (m, 10H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 163.98, 155.24, 142.34, 140.08, 131.92, 131.59, 128.33, 127.45, 126.78, 50.92, 42.19, 34.03, 28.05, 23.72. Vypočítáno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ (324.43): C, 70.34; H, 7.46; N, 17.27; a nalezeno: C, 70.30; H, 7.39; N, 17.41. Log P: 2.84, CLogP: 5.056.

***N*-Benzyl-5-cyklooktylaminopyrazin-2-karboxamid (3c).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 82,8 %. $T_f = 103.8-105.3$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3289, 2923, 2852, 1659. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.76 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CONH), 8.51 (s, 1H, 3H), 7.86 (s, 1H, 6H), 7.62 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.32 – 7.24 (m, 4H, ArH), 7.24 – 7.17 (m, 1H, ArH), 4.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.07 – 3.94 (m, 1H, CH), 1.86 – 1.73 (m, 2H, CH_2), 1.73 – 1.38 (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 163.97, 155.24, 142.34, 140.08, 131.88, 131.54, 128.33, 127.44, 126.78, 49.91, 42.18, 30.96, 27.15, 25.15, 23.32. Vypočítáno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ (338.46): C, 70.98; H, 7.74; N, 16.55; a nalezeno: C, 71.10; H, 7.68; N, 16.53. Log P: 3.25, CLogP: 5.615.

***N*-Benzyl-6-cyklohexylaminopyrazin-2-karboxamid (4a).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 71,2 %. $T_f = 108.1-110.0$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3237, 2929, 2850, 1683. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.85 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CONH), 8.17 (s, 1H, H3), 8.05 (s, 1H, H5), 7.35 – 7.13 (m, 6H, ArH, NH), 4.51 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.98 – 3.88 (m, 1H, CH), 1.94 – 1.84 (m, 2H, CH_2), 1.73 – 1.64 (m, 2H, CH_2), 1.61 – 1.51 (m, 1H, CH_2), 1.43 – 1.32 (m, 2H, CH_2), 1.27 – 1.14 (m, 3H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 164.19, 153.02, 141.65, 139.64, 136.80, 128.95, 128.46, 127.16, 126.92, 48.03, 42.32, 32.35, 25.56, 24.46. Vypočítáno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ (310.40): C, 69.65; H, 7.14; N, 18.05; a nalezeno: C, 69.68; H, 7.19; N, 17.91. Log P: 2.42, CLogP: 4.497.

***N*-Benzyl-6-cykloheptylaminopyrazin-2-karboxamid (4b).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 48,2 %. $T_f = 114.8-116.2$ °C IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3316, 2925, 2854, 1683. ^1H NMR (500 MHz, aceton) δ 8.56 (bs, 1H, CONH), 8.37 (s, 1H, H3), 8.10 (s, 1H, H5), 7.49 – 7.30 (m, 4H, ArH), 7.30 – 7.17 (m, 1H, ArH), 6.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 4.61 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.14 – 4.05 (m, 1H, CH), 2.03 – 1.95 (m, 2H, CH_2), 1.71 – 1.43 (m, 10H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, acetone) δ 164.70, 153.65, 142.34, 140.34, 137.69, 130.54, 129.23, 128.18, 127.78, 51.85, 43.31, 34.98, 29.03, 24.84. Vypočítáno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ (324.43): C, 70.34; H, 7.46; N, 17.27; a nalezeno: C, 70.21; H, 7.58; N, 17.14. Log P: 2.84, CLogP: 5.056.

***N*-Benzyl-6-cyklooktylaminopyrazin-2-karboxamid (4c).** Bílá krystalická látka. Výtěžek: 67,5 %. $T_f = 94.7-96.2$ °C. IR (cm^{-1} , ATR-Ge) 3319, 2921, 2852, 1656. ^1H NMR (500 MHz, acetone) δ 8.49 (bs, 1H, CONH), 8.36 (s, 1H, H3), 8.10 (s, 1H, H5), 7.41 – 7.32 (m, 4H, ArH), 7.30 – 7.24 (m, 1H, ArH), 6.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 4.60 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.16 – 4.08 (m, 1H, CH), 1.92 – 1.79 (m, 2H, CH_2), 1.78 – 1.66 (m, 2H, CH_2), 1.65 – 1.46 (m, 10H, CH_2). ^{13}C NMR (125 MHz, acetone) δ 164.63, 153.64, 142.31, 140.20, 137.80, 130.49, 129.28, 128.31, 127.86, 50.82, 43.42, 32.45, 27.90, 26.42, 24.55. Vypočítáno pro $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ (338.46): C, 70.98; H, 7.74; N, 16.55; a nalezeno: C, 70.93; H, 7.84; N, 16.59. Log P: 3.25, CLogP: 5.615.

Antimykobakteriální aktivita

U všech připravených látek byla testována aktivita vůči *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a třem kmenům atypických mykobakterií – *M. kansasii* a dvěma kmenům *M. avium* dle metodik uvedených například v příloze **P6**. Sloučeniny byly testovány ve finálních koncentracích 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 a 1,56 $\mu\text{g/ml}$.

Antibakteriální a antifungální aktivita

Antibakteriální a antifungální aktivita byla hodnocena dle běžně užívaných metodik popsanych například v příloze **P6**.

Cytotoxicita

U sloučenin s nejvyšší antimykobakteriální aktivitou byla hodnocena cytotoxicita na HepG2 buňkách s využitím postupů popsanych v příloze **P5**. K testování byly použity HepG2 buňky, pasáž 35 - 36.

METODIKA HODNOCENÍ INHIBICE SYNTÉZY TDM, TMM A PIMs.

Kultivace *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra probíhala dle podmínek popsaných v příloze P6. Mykobakterie byly kultivovány 20 hod s testovanou látkou (koncentrace 5 µg/ml) či INH (koncentrace 5 µg/ml). Poté byla přidána radioaktivní značka (¹⁴C octan sodný v koncentraci 0,5 µCi/ml) a následovala kultivace po dobu 24 hod (37 °C, mícháno). Poté byly mykobakterie odstředěny, promyty fyziologickým roztokem a následně usmrceny a extrahovány směsí CHCl₃ s CH₃OH v poměru 1:2 (1×, 1,5 hod, 56 °C) a následně směsí v poměru 2:1 (2×, 2 hod, 56 °C). Organické frakce byly odebrány, spojeny a vysušeny pomocí N₂. Ke zbytku byla přidána směs CHCl₃, CH₃OH a H₂O v poměru 4:2:1. Po odstředění a rozdělení vrstev byla odebrána spodní organická fáze, vysušena pod N₂ a zbytek byl rozpuštěn ve 200 µl směsi CHCl₃ a CH₃OH (2:1). ¹⁴C značené TMM, TDM a PIMs byly separovány pomocí TLC (desky Silica 60 F₂₅₄, nanášeno 10000 dpm). Mobilní fáze se lišily dle separovaných složek:

- PIMs: CHCl₃ : CH₃OH : NH₄OH : H₂O (65:25:0,5:4) – lze užít i k analýze TMM/TDM
- TMM/TDM: CHCl₃ : CH₃OH : H₂O (40:8:1).

Vizualizace: TLC desky byly založeny s fotografickým filmem Kodax Biomax MR a následně uchovávány 5 dnů při -70 °C. Následně byly filmy vyvolány a dosušeny při laboratorní teplotě.