

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



**DERIVÁTY 5-ALKYLPYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ
Kyseliny**

JAKO POTENCIÁLNÍ ANTIINFECTIVA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

PharmDr. Jan Zitko, Ph. D.

Hradec Králové 2017

Martina Halířová

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce PharmDr. Janu Zítkovi Ph. D. za pomoc, ochotu a obrovskou trpělivost při vypracovávání této práce. Další velké poděkování patří mojí rodině za podporu a pevné nervy. V neposlední řadě chci poděkovat všem, kteří se podíleli na biologickém testování nových látek.

Děkuji i za finanční podporu projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (SVV 260 401) a projektu GAČR 17-27514Y.

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

Martina Halířová

V Hradci Králové 15.5.2017

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
2	Cíl diplomové práce	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Tuberkulóza	10
3.2	Původce - Mycobacterium tuberculosis.....	11
3.3	Patofyziologie.....	12
3.4	Epidemiologie.....	14
3.5	Očkování proti TB	16
3.6	Diagnostika	18
3.7	Rezistence	20
3.8	Léčba	23
3.8.1	Léčiva první linie	25
3.8.2	Léčiva druhé linie	30
3.8.3	Nová antituberkulotika.....	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Použité chemikálie, přístroje, metody.....	39
4.2	Výchozí látky - 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny	41
4.3	Příprava produktu.....	43
4.3.1	Obecný (typický) postup přípravy.....	44
4.4	Nově připravené sloučeniny	46
4.5	Výsledky biologického hodnocení	65
4.5.1	Antimykobakteriální aktivita.....	65
4.5.2	Hodnocení in vitro cytotoxicity.....	69
4.5.3	Antibakteriální aktivita	72
4.5.4	Antifungální aktivita	73

5	DISKUZE	74
6	ZÁVĚR.....	78
7	ABSTRAKT	80
8	ABSTRACT.....	81
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	82

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

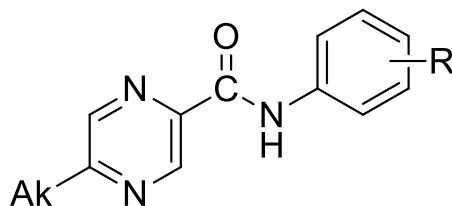
AIDS	syndrom získaného selhání imunity (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
Ak	alkylový řetězec
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacil Calmette – Guérin
CDI	karbonyldiimidazol
CFU	jednotky tvořící kolonie (<i>Colony-Forming Units</i>)
CNCTC	Česká národní sbírka typových kultur (<i>Czech National Collection of Type Cultures</i>)
CPX	ciprofloxacín
CYP3A	cytochrom P 3A
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DOTS	režim plně kontrolované léčebné péče (<i>Directly Observe Treatment Short Course</i>)
DP	diplomová práce
EMA	European Medicine Agency
EMB	ethambutol
ETC	Electron Transport Chain
EtOAc	ethylacetát
FAS-II	synthasa mastných kyselin (<i>Fatty Acid Synthase</i>)

FDA	Food and Drug Organization
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která inhibuje 50 % buněk
IČ, IR	infračervené světlo
IGRA test	Interferon Gamma Release Assay test
INH	isoniazid
INHA gen	gen inhibin alfa podjednotky
IS	index selektivity
katG	enzym katalasa/peroxidasa
kys.	kyselina
log <i>P</i>	rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda
M.	<i>Mycobacterium</i>
MDR	mnohočetná léková rezistence (<i>Multidrug-Resistant</i>)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTD test	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Direct test
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	nukleová kyselina

NMR	nukleární molekulová resonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NÚ	nežádoucí účinky
PAS	<i>para</i> -aminosalicylová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
POA	pyrazin-2-karboxylová kyselina
PPD	proteinový purifikovaný derivát
PZK	pyrazinkarboxylová kyselina
RFM	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RpsA	ribosomální protein S (<i>Ribosomal Protein SA</i>)
RR	rifampicin rezistentní (<i>Rifampicin Resistance</i>)
TAC	thioacetazon
TB	tuberkulóza
TH1	pomocné lymfocyty
T-lymfocyty	
TLC	tenkovrstvá chromatografie (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
tRNA	transferová ribonukleová kyselina (<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)
XDR	extenzivní léková rezistence (<i>Extensive Drug Resistance</i>)

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je příprava série 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů či podobných derivátů s potenciální antimykobakteriální, resp. antimikrobní aktivitou.



Nejprve vypracujeme literární rešerši na téma vztahů struktura-účinek dříve připravených derivátů a poté navrhne finální struktury. Budeme se soustředit na perspektivní látky a na metody jejich syntézy. Těžištěm činnosti bude experimentální práce.

U všech produktů budou stanoveny fyzikálně-chemické vlastnosti jako například teplota tání, NMR a IČ spektra, elementární analýza atd. Výsledky práce budou vyhodnoceny v závěru diplomové práce, kde budou diskutovány vztahy struktura-účinek v rámci připravené série sloučenin.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je závažné infekční onemocnění, jehož původcem je velmi odolná mykobakterie. Infekci každoročně podlehnou tři miliony lidí, z toho 250 000 dětí, a proto patří mezi nejčastější smrtící onemocnění ve světě [1]. Latentní forma TB se vyskytuje u třetiny populace. Každou sekundu infekce napadne dalšího člověka. Většina nemocných (95 %) jsou lidé z rozvojových zemí [2]. V České republice se každý rok potýkáme s cca 500 případy, z toho jednu pětinu tvoří imigranti [3].

Pojem tuberkulóza byl poprvé vysloven v roce 1834 panem Schönleinem, který tímto pojmem charakterizoval typický jev nemoci – vytvoření uzlíků neboli granulomů [1]. Ale o objasnění původce onemocnění se zasloužil až v roce 1882 německý lékař a mikrobiolog Robert Koch. V roce 1905 mu za tento objev byla udělena Nobelova cena. Podle Kocha byla bakterie pojmenována jako Kochův bacil. Obor, který se zabývá tuberkulózou, se nazývá ftizeologie. Zdrojem nákazy je kašlající, kýchající člověk napadený mykobakterií. V dřívějších dobách existovala i nákaza střešní, kdy se jedinec nakazil z mléka krávy trpící TB. Nejvíce riziková jsou pacienti s AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) nebo s jiným imunodeficitem. Mykobakterie jsou rezistentní bakterie poškozující především dýchací orgán – plíce, ale také jiné orgány jako např. pleuru, mízní uzliny, kosti, klouby, kůži nebo urogenitální trakt. Hostitelem může být člověk i zvíře. Po šesti týdnech od proniknutí bakterie do organismu vyvolají tělu vlastní buňky alergickou reakci IV. typu. K dalším rizikovým faktorům aktivujícím patogena patří věk, alkohol, drogy, záření, další choroby, špatná životospráva atd. [1].

Světová zdravotnická organizace (WHO, World Health Organisation) předpokládá, že v roce 2050 už nebude TB patřit k nejrizikovějším infekcím na světě [1].

3.2 Původce - *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis, dříve nazývaná jako Kochův bacil, je středně dlouhá Gram pozitivní tyčinka o velikosti 1,5–5 μm , vysoce rezistentní k různým druhům léčiv. Je to aerobní bakterie způsobující infekční chorobu tuberkulózu. Zařazujeme ji do řádu *Actinomycetales*, čeledi *Mycobacteriaceae* a rodu *Mycobacterium* [4]. Optimální teplotou pro růst je 37–38 °C [1]. Díky acidoresistenci se špatně barví organickými barvivy dle Grama, je odolná vůči kyselinám, zásadám i alkoholu. Tato schopnost je připisována její typické vlastnosti a to velkému obsahu lipidů v její buněčné stěně. Její významnou složku tvoří mykolové kyseliny jakožto jedny z nejdelších mastných kyselin v přírodě. Mezi další charakteristiky patří pomalý růst na kultivačních půdách (tři až šest týdnů), generační doba (20–30 hod.), nepohyblivost a neschopnost tvořit spóry. Do rodu *Mycobacterium* patří ještě další druhy jako např. *Mycobacterium africanum* způsobující TB v Africe, *Mycobacterium bovis* postihující krční uzliny, a také *Mycobacterium ulcerans* projevující se jako Burulský vřed (mykobakteriíza projevující se jako nodulární útvar postihující rozsáhlé kožní oblasti) [5]. Onemocnění podobné TB působí *M. avium-intracelulare*, *M. kansasii*. *M. leprae* je příčinou lepry. Přítomnost patogena prokazujeme mikroskopicky barvením dle Ziehla-Neelsena a fluorescenčním barvením nebo pak kultivační metodou, která je více citlivá na záchyt. K nepřímému průkazu slouží metoda QuantiFeron® (podrobněji viz kapitola Diagnostika), kdy test u očkovaných jedinců je negativní.

Za optimálních podmínek bakterie na vzduchu přežívá jednu až dvě hodiny, za slunečního svitu a teploty vyšší než 60 °C hynou. Tělo bakterie se skládá z 60 % vody, anorganických a organických látek (lipidů, polysacharidů a proteinů). Proteinová část zajišťuje humorální i celulární obranný systém, polysacharidy jen humorální imunitu. Přítomnost mykobakteriálních lipidů snižuje účinnost makrofágů v alveolech, protože jsou pro organismus toxické [1].

3.3 Patofyziologie

Nejčastěji je pacient nakažen přes dýchací ústrojí kapénkovou cestou od infikované osoby. Mykobakterie se usídlí v plicích a pomalu se množí, proto je inkubační doba velmi dlouhá, až čtyři týdny [6].

Infekce se rozděluje na dvě fáze, primární a sekundární. Primární fáze znamená první setkání pacienta s infekcí. Po proniknutí mykobakterie do plic nastává její množení a aktivace buněčné imunity jedince.

Po deseti dnech vzniká v plicích tzv. Ghonův fokus neboli specifický tuberkulózní fokus kulovitého tvaru o velikosti 1–2 mm. Skládá se z epiteloidních buněk a buněk Langhansových. Epiteloidní buňky jsou shluky makrofágů, které fagocytují mykobakterie a které mají pozměněnou morfologickou stavbu těla. Větší počet shluků makrofágů vytváří mnohojaderné Langhansovy buňky [1]. Makrofágy dokáží zabít jen patogeny umístěné intracelulárně. K jejich aktivaci jsou potřebné interferony uvolňované subsetem TH1 T-lymfocytů. Makrofágy uvolňováním TNF (tumor nekrotizující faktor) organismu oznamují, že byl napaden infekcí. TNF má obrovské regulační a efektorové účinky [7].

Po vytvoření fokusu se mykobakterie během několika hodin dostanou lymfatickými cévami do uzlin. V důsledku toho dochází k jejich zvětšení a v kombinaci se zánětem v plicích to označujeme jako primární tuberkulózní komplex. Díky zásahu buněčné imunity nemocného se až 90 % případů bez problémů zhojí. Důkazem o přítomnosti infekce je po čtyřech až šesti týdnech přecitlivělost na tuberkulin. Pokud ale ke zhojení nedojde, uzlík zesýrovatí, podlehně kazeózní nekróze. Na serózních blanách, sliznicích či jiných orgánech se může objevit tuberkulózní exudát jako projev produktivní fáze zánětu. Ve složení obsahuje nejvíce fibrin, makrofágy a lymfocyty. Stejně jako uzlík, tak i exudát podléhá zesýrovatění šířícímu se na okolní tkáň [1].

Období primární fáze bývá z velké většiny asymptomatické, u dětí se může objevit horečka. Makrofágy umí bakterie eliminovat, ale někdy vzniknou tzv. spící mykobakterie. U velmi malého procenta pacientů se může infekce rozšířit i do dalších orgánů [1, 6].

Sekundární neboli postprimární infekce začíná v době, kdy se mykobakterie po delší době latence (řada let) znova probudí, popř. pokud dojde k další exogenní reinfekci. Důležitý je dobrý imunitní stav pacienta, aby se s takovou reakcí dokázal vypořádat co nejrychleji. Pokud ale bude obrana makrofágů nad míru, nezničí jen patologické buňky ale i buňky tělu vlastní. Projevem bude destrukce plicní tkáně, eroze malých cév (hemoptoe) i destrukce jiných důležitých tkání. Sekundární fáze je typická pro dospělé jedince [1, 6].

Mezi nejvíce se vyskytující symptomy patří únava, nechutenství, hubnutí, ztráta fyzického výkonu, horečka, pocení, suchý a poté vlhký kašel se sputem. Tyto příznaky však ani po léčbě antibiotiky neustupují [8].

K rizikovým faktorům zvyšujícím pravděpodobnost výskytu TB patří:

- 1) Věk – generalizovaná tuberkulóza u dětí do 5 let, nad 65 let vlivem poklesu imunity
- 2) Pohlaví – zpočátku onemocnění převažuje u žen, poté ve středním věku u mužů
- 3) Expozice – profesionální, familiární, nahodilá
- 4) Iatrogenní vlivy – užívání glukokortikoidů, cytostatik a dalších látek snižující funkci imunity
- 5) Přidružené onemocnění – virové infekce, podvýživa, onemocnění jater a ledvin, poruchy krvevotvorby, vředy, diabetes mellitus, alkoholismus, HIV infekce / AIDS (100–200× větší riziko)
- 6) Osoby s nízkými socioekonomickými podmínkami (bezdomovci, vězni, závislí, lidé bez práce atd.) [1]

3.4 Epidemiologie

Epidemiologie tuberkulózy se zaznamenává dvě stě až tři sta let. Většinou přijde epidemická vlna s rychlým navýšením incidence nemocných a následně klesne. Mezi sledované faktory epidemiologie patří prevalence, incidence, recidiva tuberkulózy a rizika infekce [1].

Nemoc je rozšířena po celém světě. Přibližně jedna třetina světové populace je latentně nakažena *M. tuberculosis*. Onemocnění však může být symptomatické tak i asymptomatické. Počet nakažených jedinců s aktivní TB se neustále mění, v chudých zemích je to především mládež, naopak např. v USA jde spíše o staré lidi, důvodem je zlepšení preventivních opatření. V Americe došlo k velkému nárůstu nemocných v období 90. let, kdy přibýlo lidí infikovaných HIV, zvýšila se migrace cizinců z rizikových zemí a snížila se compliance pacientů. Pokud je již jedinec nakažen HIV virem, stává se velmi snadným terčem pro mykobakterie, u mužů infikovaných HIV virem je riziko propuknutí aktivní TB jednasedmdesátkrát větší, u žen až osmdesátkrát [1].

V roce 2015 bylo odhadnuto 10,4 milionu nových případů po celém světě, tedy o 1,4 % méně než v roce 2014. Více než 60 % všech případů tvořilo pouze šest zemí: Indie, Čína, Nigérie, Pákistán a Jižní Afrika. V tom samém roce na TB zemřelo 1,8 milionu lidí, z toho 0,4 milionu byli lidé i s HIV infekcí [9].

Globálně v období 2000–2015 klesl počet infikovaných jedinců a počet úmrtí o 22 %. Od roku 2010 byl zaznamenán největší pokles úmrtnosti na TB ve východním Středomoří a v evropských regionech (6,5 % za rok), nejmenší pak v africkém regionu (2,2 % za rok) [9].

Statistiky České republiky ukazují mírný pokles nemocných až v roce 2000 a 2001. Velký vliv na stoupající počet nemocných mají cizinci tvořící 17 % incidentních případů, dále bezdomovci, vězni, lidé bez práce atp. V roce 2010 infekce zabila v ČR dvacet osm lidí, z toho polovina z nich užívala antituberkulotika [1, 3].

V roce 2013 byl v ČR zaznamenán výrazný pokles v porovnání s předešlým rokem. Do registru TB bylo zaevidováno 502 případů, z toho u 455 jedinců zasáhla mykobakterie dýchací systém, u 95 % to byly plíce. České ženy postihuje patogen především v období stáří, a to od 75 let, u mužů jsou záznamy v průměru od 45 let, děti bývají nakaženy minimálně (v roce 2013 byly hlášeny tři případy). V porovnání mužů se ženami se onemocnění více vyskytuje u mužů v poměru 2,1:1. V tom samém roce bylo do registru TB zapsáno čtyřicet čtyři případů podlehnutí tuberkulóze, avšak čtyřicet jedna jedinců nebylo vůbec léčeno antituberkulotiky [3].

3.5 Očkování proti TB

První záznamy o prevenci TB jsou z roku 1953, kdy se započalo s očkováním novorozenců i dospělých. Od roku 1960 bylo očkování povinné pro novorozence a přeočkování pro 11leté děti, které byly tuberkulin negativní. V období od roku 1986 až do 1994 se v určitých krajích ČR mohli rodiče sami rozhodnout, zda své dítě naočkují či nikoli. Avšak v důsledku rostoucího počtu nemocných se očkování opět stalo povinné. V roce 2009 bylo přeočkování zrušeno a následně i celoplošné povinné očkování novorozenců s účinností od 1.11.2010 [10].

V listopadu 2010 byla vydána vyhláška stanovující pravidla pro očkování novorozenců. Lékař novorozeneckého oddělení společně se zákonnými zástupci dítěte vyplní vyhláškou stanovený dotazník, na jehož základě se rozhodne, zda se dítě bude očkovat či nikoli [11].

Mezi nejčastěji používané vakcíny patří BCG vakcína neboli bacil Calmette – Guérin. Albert Calmette a Camille Guérin byli vědci pracující v Pasteurově laboratoři a zabývali se právě vakcínou proti TB [10]. Pánové během 13 let vyzkoušeli dvě stě třicet pasáží bovinního typu *Mycobacteria* na bramborové půdě s glycerínem a žlučí z hovězího dobytka. Za jejich snahu a péči byla vakcína pojmenovaná podle jejich jmen [4].

BCG vakcína se získává pouze z *Mycobacterium bovis* prostřednictvím krávy nakažené tuberkulózní mastitidou. Zjistilo se, že různé subkmény mají různě silný účinek. Na základě zvoleného subkmény se určí koncentrace tuberkulózních zárodků na vakcínu. Pro potřeby lyofilizace a skladování jsou součástí i mrtvé organismy. Mezi nejvíce využívané BCG subkmény patří Pasteur-1173 P2, Tokyo-172, Copenhagen-1331 a Glaxo-1077 [4].

Dítě se nejčastěji očkuje ve věku od čtyř dní do šesti týdnů do podkoží deltového svalu. Potvrzením o imunizaci dítěte je tvrdý červený pupenec, který se vytvoří v místě vpichu po třech až čtyřech týdnech od očkování. U dítěte se poté aktivuje buněčná imunita a vytvoří se paměťové buňky, které zajistí rychlejší odpověď imunitního systému po napadení mykobakterií. Po třech až šesti

měsících od očkování se zkontrolují výsledky kalmetizace vyšetřením místa vpichu a kontrolou regionálních uzlin [4, 10].

Vakcinace má i své negativní stránky. Kvůli zbytkové virulenci způsobuje vedlejší účinky jako například osteomyelitidu, artritidu (nejčastěji u dětí očkovaných v novorozeneckém věku), rozsáhlé a větší ulcerace, zvětšení regionálních uzlin, keloidní jizvy, podkožní a svalové granulomy, subkutánní abscesy s fluktuací. V případě lokálních vedlejších účinků léčba spočívá v aplikaci Framykoinu® (bacitracin, neomycin) [4, 12-16].

V případě, že daná osoba trpí horečnatými stavy či jiným onemocněním, byla u něj zjištěna imunodeficience, je léčen kortikoidy; imunosupresivy a dalšími léky ovlivňující imunitu, nebo pokud byla u něj zjištěna hemoblastóza, pak vakcinace nemůže být provedena. Další zvláštní kontraindikace k očkování jsou osoby s pozitivním tuberkulinovým testem, spalničky a černý kašel (odstup od nemoci alespoň šesti měsíců), těhotné ženy, pacienti s tendencí ke vzniku keloidních jizev, jedinci s generalizovanými kožními ekzantémy, symptomatictí pacienti a asymptomatické HIV pozitivní osoby [4, 12–16].

3.6 Diagnostika

V případě, že máme podezření na tuberkulózu, je důležité, aby byl pacient pečlivě vyšetřen. Klinický lékař spolu s klinickým mikrobiologem důkladně stanoví anamnézu, určí etiologické agens, provedou rentgen plic, biochemické a hematologické testy. Diagnostika nemocného by se měla vždy provádět před zahájením antituberkulózní léčby. Důraz je kladen na správný odběr vhodné tkáně a na její transport v chladicích zařízeních do laboratoře. Jako vhodný vzorek k testování se u respiračních onemocnění využívá sputum, případně pleurální výpotek nebo bronchoalveolární laváž. Při postižení urogenitálních cest se odebírá vzorek moči, menstruační krev nebo ejakulát. Pokud mykobakterie zasáhly oblast GITu, pak k otestování potřebujeme odebrat žaludeční obsah z lačného žaludku. U biologických materiálů, jako je moč a sputum, je potřeba získat větší množství vzorku v několika po sobě následujících dnech. Rozborem krve zjistíme stav pacientovy imunity.

Pro mikroskopické vyšetření se musí preparáty obarvit fluorescenčním barvivem, popřípadě méně často využívaným Ziehl-Neelsenovým barvivem. Mikroskopie nám detekuje acidorezistentní tyčky během několika hodin. Živé mykobakterie kultivujeme na tekutých i pevných půdách, avšak výsledek zjistíme až po delší době, šesti až devíti týdnech.

K rychlejším metodám trvajícím jen několik hodin patří nejnovější molekulární biologické metody, které se označují jako *Mycobacterium tuberculosis* Direct (MTD) test nebo Polymerase Chain Reaction (PCR). K identifikaci je potřeba specifický úsek nukleové kyseliny (NK) bakterie. Principem je komplementarita hledaného úseku NK se specifickým úsekem značeným genetickými sondami. Vhodné je tyto testy doplnit o kultivační vyšetření, které nám potvrdí živé patogeny a také o histologii, která nám ukáže, zda se u pacienta už někdy objevily buňky a změny typické pro specifický granulomatózní zánět.

Aby byla léčba účinná, musí se také určit, do jaké míry jsou bakterie rezistentní a citlivé vůči antituberkulotikům.

K identifikaci onemocnění se využívají i nepřímé diagnostické metody. Velmi účinné jsou IGRA testy (Interferon Gamma Release Assay), u nichž je potřeba pacientova krev. Krev se testuje na přítomnost interferonu gama (IFN- γ). Pozitivita testu nám potvrzuje, že specifické lymfocyty se již setkaly s *M. tuberculosis*. Typickým příkladem IGRA testu je QuantiFeron[®]-TB Gold test, který využívá specifické proteinové antigeny *M. tuberculosis*. Tyto antigeny najdeme pouze u *M. tuberculosis*, *M. marianum*, *M. kansasii* a *M. szulgai*, ale u *M. bovis* nikoliv. QuantiFeron[®]-TB Gold test se používá především k identifikaci latentní formy TB (lze dokázat i aktivní formu). Nevýhodou je, že pokud bude test negativní, neznamená to, že pacient nemá TB.

Dalším možností, jak určit imunitní stav pacienta je tuberkulinový test. Principem je stanovení pozdní přecitlivělosti na proteinový purifikovaný derivát (PPD) z určitého kmene *M. tuberculosis*. Po 72 hodinách se v místě vpichu objeví kožní indurace a měří se její průměr. Jestli je indurace větší než 5 mm, pak je test pozitivní. Pacienti očkovaní BCG vakcínou nebo po napadení jiným kmenem mykobakterie mohou být také tuberkulin pozitivní. Průměr indurace je klíčovým k rozlišení postinfekční a postvakcinační buněčné imunity. Pacienti s HIV nebo se sníženou funkcí imunity mohou mít tento test negativní [17].

3.7 Rezistence

Zpočátku byla tuberkulóza považována za nevléčitelnou nemoc a nemocný byl izolován v sanatoriích. Poté, co byly objeveny látky s antimykobakteriální aktivitou, se status nemoci změnil na nemoc zvládnutelná antibiotiky. Po zavedení monoterapie streptomycinu se v roce 1944 objevila první rezistence. Naštěstí byly vyvinuty další látky s antituberkulotickou aktivitou a zjistilo se, že jejich kombinací se riziko vzniku rezistence sníží [18].

Rezistence bakterií na léčbu může být primární, tj. nemocný nikdy dané léky neužíval, a přece na ně patogeny nereagují. Problémem je netypická struktura buněčné stěny mykobakterie, která obsahuje mykolové kyseliny velmi málo propustné pro ostatní látky. Velkou roli hraje i přítomnost efluxních mechanismů, které zabraňují průniku tetracyklínům, fluorochinolonům a aminoglykosidům. Ve srovnání s jinými bakteriemi, kde získaná rezistence je způsobená pomocí genetických elementů (plazmidy, integrony, transpozony), u mykobakterie je příčinou mutace chromozomálních genů [18].

Příčinou sekundární intolerance je u většiny případů nedodržení doporučení a postupů léčby (DOTS, Directly Observed Treatment Short-Course) jako například inkompliance pacienta, předčasně ukončená léčba, nízká/vysoká dávka léčiv nebo nekontrolované terapie lékařem [12]. DOTS je doporučení WHO, které v pěti bodech shrnuje strategie snížení rizik tuberkulózy. První bod klade důraz na vládu a její finanční podporu, v druhém bodě se požaduje diagnostika pomocí kvalitní bakteriologie, třetí bod se zabývá standardizovanou léčbou a dohledem nad pacientem, čtvrtý dostatečnou dodávkou léčiv a posledním požadavkem je případy zaznamenávat.

Stále ale největší problém tvoří rozvíjející se multirezistence (MDR) a extenzivní rezistence (XDR). Multirezistence znamená odolnost patogena na dvě nejdůležitější léčiva první linie (isoniazid a rifampicin), vzniká v důsledku nedodržování pravidel léčby. Dle citlivosti se indikuje čtyř terapie po dobu dvou měsíců. Pravděpodobnost vyléčení je u 60–80 % jedinců [6].

Dle odhadů WHO bylo v roce 2015 na celém světě 480 tisíc nových případů MDR-TB, nejvíce v Číně, Indii a Ruské federaci [9]. V Evropě multirezistencí trpí nejvíce Norsko, Švédsko a Holandsko, kde se rezistence vyskytuje až u 70 % případů, na druhou stranu na jihu Evropy je to jen 15 % [18]. V ČR je zaznamenáno přibližně třicet osob trpících MDR-TB, většinou jsou to jedinci narozeni mimo české území [1]. MDR-TB se objevuje dvacetkrát až osmdesátkrát častěji jako sekundární rezistence (tj. u pacientů v minulosti léčených na TB) než jako primární rezistence [6, 19].

Extenzivní rezistence (XDR) zahrnuje multirezistenci v kombinaci s odolností na jedno antituberkulotikum druhé volby (amikacin, kapreomycin, kanamycin) podávaných injekčně a jedno fluorochinolonové antibiotikum. Léčba XDR-TB je ještě dražší než MDR-TB. Účinnost je přibližně u 40 % nemocných [1]. XDR-TB je vzácná, avšak ve 117 zemích byl během roku 2015 hlášen minimálně jeden případ. Odhaduje se, že ze všech MDR-TB případů je přibližně 9,5 % XDR-TB [9].

Další rezistencí je rifampicin rezistentní tuberkulóza (RR-TB) tzn. odolnost na rifampicin s nebo bez rezistence k ostatním antituberkulotikům, detekována pomocí fenotypové nebo genotypové metody. Zahrnuje jakoukoli rezistenci na rifampicin, jak ve formě mono-rezistence, poly-rezistence, MDR nebo XDR. V roce 2015 bylo odhadnuto 3,9 % nových případů MDR/RR-TB (kombinace RR a MDR) a 21 % již dříve léčených případů. Největší počet MDR/RR-TB je v Číně, Rusku a Indii (45 % globálního celku) [9].

V roce 2009 lékaři definovali nový typ rezistence a to nejzávažnější formu, kdy mykobakterie je rezistentní na veškerá léčiva z první i druhé řady antituberkulotik. Takový druh nazvali totálně rezistentní tuberkulóza (TDR-TB totally drug-resistant TB). TDR-TB byla poprvé zaznamenána u jedinců z Íránu, Iráku a Afghánistánu. Většina z nich již byla dříve léčena antituberkulotiky první řady, poté aplikovali kombinaci amoksiklavu či klarithromycinu s nidrazidem (15 mg/kg), avšak neúspěšně [19, 20]. TDR-TB je však neoficiální typ rezistence, WHO neuznala možnost výskytu TDR-TB. Nová léčiva jsou stále ve vývoji a nelze o nich tvrdit, že jsou vůči totálně rezistentním formám neúčinné [9]. Navíc nové

studie prokazují, že MIC bedachilinu na kmeny TDR *M. tuberculosis* je v rozmezí hodnot 0,125–0,5 mg/l [21].

Léčba rezistentních forem je obrovskou zátěží pro kontrolu nemocného. Terapie vynucuje velmi toxická léčiva, je nákladná a vede k četným vedlejším účinkům. Mezi další nevýhody patří šíření MDR kmenů, které zvyšují riziko vzniku jiným závažným rezistencím. Proto je kladen velký důraz na nalezení nových látek s rychlou sterilizační aktivitou působící na latentní i aktivní formy patogena. Pochopením mechanismu vzniku rezistence a dodržování DOTS by se mohl tento rostoucí problém po celém světě vyřešit [22, 23].

3.8 Léčba

Léčba tuberkulózy trvá přibližně šest až dvanáct měsíců. Terapie zahrnuje léčiva spadající do skupiny antituberkulotik první řady a později se rozšířila i o druhou řadu. Léčiva jsou používána především na léčbu tuberkulózy, nevýhodou je často vznikající rezistence. Jejich účinek je převážně baktericidní, v menší míře bakteriostatický. Postup v léčení pacienta v ČR musí splňovat pravidla a doporučení, které jsou stanovené Zákonem o ochraně veřejného zdraví a vyhláškou Ministerstva zdravotnictví ČR. Předpokladem účinnosti je striktní dodržování režimu DOTS.

Po celé léčebné období jsou jednorázově podávány kombinace léčiv ve dvou fázích. V případě, že bychom podávali pouze jednu látku, došlo by k eradikaci citlivých mutantů a zároveň by se mohly pomnožit rezistentní organismy. Důsledkem by byla léčba neúčinná, vedoucí k rezistenci mikrobiální populace. Takový typ rezistence označujeme jako získanou neboli sekundární. A proto je důležité, aby se terapie TB skládá z kombinací antituberkulotik [4].

Iniciální neboli intenzivní část léčby trvá dva až tři měsíce, kdy pacient užívá léky jedenkrát denně nebo třikrát týdně v závislosti na rozsahu onemocnění. Po dobu tří měsíců je nemocný hospitalizován na infekčním oddělení, aby se zabránilo rozšíření infekce na další zdravé jedince. Intenzivní terapie zničí většinu populace mykobakterií a pacient se stane v rámci svého okolí neinfekčním [6, 16].

Druhá neboli pokračovací fáze probíhá již ambulantně. Jejím hlavním úkolem je zničit zbylé mykobakterie a co nejvíce sterilizovat vzniklé tuberkulózní léze. Po dobu čtyř měsíců se podávají dvoukombinace léčiv isoniazidu a rifampicinu v jedné denní dávce. V případě zvýšeného rizika pomnožení rezistentních kmenů se přidává ethambutol. Za účelem kvalitní terapie a snížení nebezpečí vzniku rezistence je pacient pod neustálým lékařským dohledem [16].

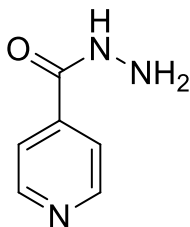
Léčebné doporučení pro MDR-TB zahrnuje intenzivní osmiměsíční léčbu pyrazinamidem a minimálně čtyřmi léčivy z druhé linie. Z druhé řady antituberkulotik vybíráme fluorochinolon (kromě ciprofloxacinu), injekční

antibiotikum, jednu látku ze skupiny aminoglykosidů (ne streptomycin), thioamid (ethioamid nebo prothioamid) a cykloserin nebo teridizon. Pokračovací fáze by měla trvat minimálně dvacet měsíců se čtyřmi účinnými léčivy s vysazením injekčního antibiotika na konci osmého měsíce, v případě pozitivní odpovědi na terapii. Dále byla provedena studie, která vyvrací požadavek WHO, že léčba by měla být dlouhodobá. Pacientům trpícím plicní TB byla po dobu devíti měsíců podávána kombinace: gatifloxacin + pyrazinamid + ethambutol + klofazimin. Součástí byla i čtyřměsíční počáteční intenzivní terapie skládající se z kanamycinu, prothionamidu a vysokými dávkami isoniazidu. Výsledkem bylo 88 % vyléčených jedinců bez relapsu s minimálními vedlejšími účinky [23].

Lidé, u kterých byla zjištěna tuberkulóza, jsou během léčby a dalších šest měsíců po ní, hlášeni ve skupině aktivní tuberkulózy. Následně v určitých intervalech probíhá kontrola jejich sputa a jiných biologických vzorků. Pokud je vše v pořádku, spadají do skupiny inaktivní tuberkulózy, ve které jsou po dobu tří let kontrolováni. Nakonec mohou být ze sledované skupiny vyřazeni, ale to platí jen tehdy, když se u nich neobjeví žádné rizikové znaky typické pro TB. Existují však i případy, kdy si lékař není jistý zdravotním stavem pacienta a zařadí ho do tzv. rizikové skupiny. V takové skupině jsou nemocní sledováni jednou ročně následujících pět let, popřípadě i déle [6, 16].

3.8.1 Léčiva první linie

ISONIAZID



Derivát kyseliny isonikotinové s antituberkulózními účinky spadající do první linie léčiv. Spektrum účinnosti zahrnuje *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* a *M. kansasii*, na které má baktericidní účinek. Bakteriostaticky působí pouze na pomalu rostoucí mykobakterie. Isoniazid je velmi specifický, na jiné bakteriální infekce nepůsobí. Je proléčivem, k aktivaci potřebuje mykobakteriální enzym katalasu/peroxidasu (KatG). Aktivované léčivo se kovalentně naváže na NAD⁺ a poté inhibuje NADH-dependentní enoyl-ACP reduktasu. Mechanismus účinku tedy spočívá v blokádě syntézy mykolových kyselin, jakožto hlavních komponent bakteriální buněčné stěny. Dále narušuje metabolismus mykobakteriálního vitamínu B₆. Isoniazid vytvoří s vitamínem komplex, který se z mikroorganismu rychle vyloučí [24, 25]

Isoniazid se podává perorálně, jídlo ale ovlivňuje absorpci a snižuje biologickou dostupnost. Doporučená denní dávka je 300 mg, maximálně 1 g/den. Distribuční objem tvoří 0,57–0,76 l/kg, prochází placentou a vylučuje se do mateřského mléka. Také se distribuuje do mozkomíšního moku [4].

Na bílkoviny krevní plazmy se váže minimálně. Poločas rozpadu je v rozmezí od jedné do šesti hodin (pomalí/rychlí acetylátory). Po čtyřadvaceti hodinách se vyloučí močí z těla ven. Metabolizace se odehrává v játrech acetylací, kdy *N*-acetyl transferasa acetyluje isoniazid na *N*-acetylisoniazid, následně je biotransformován na dva produkty, isonikotinovou kyselinu a monoacetylhydrazin. Do jaké míry acetylace proběhne, záleží na genetice každého jedince [24, 25].

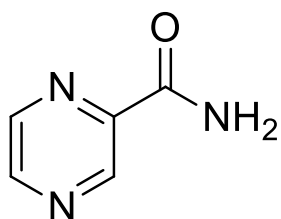
Mezi nežádoucí účinky patří vyrážka, abnormální hodnoty jaterních testů v důsledku zvýšení transaminas a z toho i plynoucí hepatitida. Interferencí s vitamínem B₆ (zvýšení exkrece, inhibice pyridoxinfosfokinasy) může způsobit

křeče a periferní neuropatii. Proto je důležité, aby pacient doplňoval vitamin B₆ [24, 26, 27].

Spolu s lékem není vhodné užívat alkohol, snižuje se účinek isoniazidu a zvyšuje se riziko hepatotoxicity. Z potravin je vhodné omezit sýry, slaná jídla, čokoládu, fazole, pivo a červené víno, protože obsahují tyramin a histamin. Tyto látky jsou metabolizovány enzymem monoaminoxidasou, jejíž činnost isoniazid inhibuje. K projevům těchto interakcí řadíme bušení srdce, pocení, zrudnutí obličeje, zimnice, bolest hlavy, svědění [28]. Naopak žádoucí je suplementace vitaminem B₆, B₁₂, hořčíkem a kyselinou listovou [6].

Nejčastějším podnětem rezistence isoniazidu je mutace v genu *katG* (nutný k aktivaci isoniazidu). V menší míře to mohou být i mutace promotorové části genu *inhA*, který je nezbytný k prodlužování řetězců mastných kyselin při tvorbě mykolové kyseliny. Studie prokázaly, že při zvýšení dávek na 10–15 mg/kg za den, lze nepříznivým mutacím předcházet [25].

PYRAZINAMID



Další léčivo z první linie antituberkulotik je proléčivo amid pyrazinové kyseliny. Ke svému účinku potřebuje mírně kyselém pH, při neutrálním pH neúčinkuje. Působí baktericidně jen na mykobakterie. Nepoužívá se na léčbu bovinního typu mykobakterií [4, 24, 29].

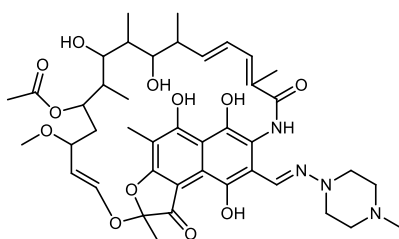
K přeměně proléčiva je potřebný bakteriální enzym pyrazinamidasa, který hydrolyzuje amidovou skupinu na pyrazinovém kruhu za vzniku kyseliny pyrazinové. Kyselina brání bakteriálnímu enzymu, synthase mastných kyselin, tvořit nové mastné kyseliny důležité pro růst a rozmnožování bakterie. Dále bylo prokázáno, že se kyselina váže na ribozomální protein S1 (RpsA) a inhibuje tak trans-translaci [24, 29].

Pyrazinamid se dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu (GIT), široce se distribuuje po celém těle. Během těhotenství není zcela kontraindikován.

V malém množství se vylučuje do mléka. Metabolizace probíhá v játrech pomocí xanthinoxidasy, při současné léčbě dny alopurinolem dochází ke zvýšení hyperurikémie. Vylučuje se ledvinami jako pyrazinová kyselina a močí pak odchází z těla pryč. Denní dávku tvoří 25 mg/kg látky, většinou 2 g.

Z negativních účinků je nejvíce závažná hepatotoxicita závisící na velikosti dávky a délce podávání. Dále může způsobit nechutenství, zvracení, nevolnost, malátnost a horečku, dysurii, hyperurikémii, artralgií, kožní vyrážky a poruchy srážlivosti. Pacienti s diabetem mellitus by měli být pečlivě sledováni, protože pyrazinamid může ovlivňovat výsledky při testování ketonů moči [4, 24, 29].

RIFAMPICIN



Širokospektré semisyntetické ansamycinové antibiotikum produkované *Streptomyces mediterranei*. Působí především

na gram-pozitivní, ale i gram-negativní organismy baktericidním účinkem. Často na něj vzniká rezistence, proto se používá především v kombinaci s jinými účinnými látkami. Mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA-dependentní RNA polymerasy u citlivých buněk, na savčí buňky enzym nepůsobí. Inhibicí enzymu se potlačí syntéza bakteriální RNA a dojde k buněčné smrti [6, 24, 30].

Rifampicin se aplikuje perorálně nebo intravenózně, dobře se vstřebává do všech tkání a tekutin. Podává se 10 mg/kg denně nebo třikrát týdně, denní dávka však nesmí překročit 600 mg [4]. Potrava může snižovat účinnost. Metabolizace probíhá v játrech. Vylučuje se především žlučí, močí odchází méně než 30 %. Až 89 % se váže na bílkoviny krevní plazmy. Poločas eliminace je cca tři hodiny [24, 30].

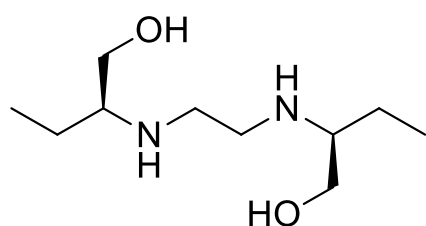
Antibiotikum je relativně dobře tolerované léčivo, dráždí oči, kůži, sliznice, může způsobit nevolnost, zvracení, únavu a abnormální funkci jater. Tělní tekutiny barví do oranžovo-červené barvy. U některých pacientů se jako vedlejší

účinek může objevit onemocnění podobné chřipce. Hepatotoxicita je menší než u isoniazidu. Dalším méně častým negativním účinkem může být pseudomembranózní kolitida [6, 24, 30].

Kombinace rifampicinu s některými léky není vhodná, dochází k snížení jejich účinku v důsledku indukce metabolických enzymů cytochromu P nebo P-glykoproteinu. Mezi nevhodné léky patří například perorální antikoncepce, blokátory vápenatých kanálů, digoxin, vastatiny. V kombinaci s antikoagulanciemi snižuje hypoprotrombinovou antikoagulační aktivitu [4]. Během léčby není vhodná konzumace alkoholu, který potencuje hepatotoxicitu rifampicinu [24, 30]. Rifampicin se také využívá k léčbě lepry a dalších stafylokokových infekcí [6].

ETHAMBUTOL

(2S,2'S)-2,2'-[ethan-1,2diylbis(azanediyl)]bis(butan-1-ol)



Ethambutol je chemoterapeutické léčivo patřící k první linii antituberkulotik.

Na mykobakterie působí bakteriostaticky, ale v kombinaci s dalšími léčivy zvyšuje jejich cidní účinek. Zabraňuje přenosu mykolové kyseliny do buněčné stěny tuberkulózní buňky. V důsledku toho může dojít i k inhibici syntézy spermidinu v mykobakteriích. Mechanismus účinku spočívá v potlačení polymerace arabinózy na arabinan blokadí arabinosyl transferasy v buněčné stěně. Výsledkem je inhibice růstu buňky a zvýšená permeabilita buněčné stěny [6, 24, 31].

Dobře se distribuuje všemi tkáněmi a tekutinami, nejvyšší koncentrace se nacházejí v erythrocytech, slinách, ledvinách a v plicích. Po perorálním podání potrava nijak neovlivňuje absorpci léčiva. Během čtyřadvaceti hodin 50 % nezměněné látky odchází močí nebo stolicí, zbytek se přemění na metabolity. Denní dávka je 15–20 mg/kg podávaná perorálně [4, 24, 31].

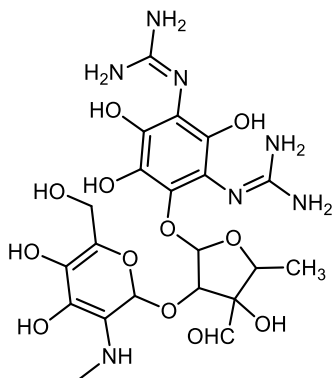
Ve své struktuře obsahuje dvě chirální centra. Tvoří tři stereoisomerní formy, enantiomery (+)-(S,S)-, (-)-(R,R)-ethambutol a opticky inaktivní diastereomer.

Pro klinické účely se dříve používal jako racemát, ale z důvodu závažných negativních účinků byl změněn na pravotočivý isomer (+)-ethambutol [32].

U ethambutolu nehrozí hepatotoxicita. Daleko závažnějším negativním účinkem je retrobulbární neuritida. Další pozorované negace jsou vyrážka, svědění, gastrointestinální obtíže, nevolnost, bolest hlavy, závratě, halucinace, dezorientace, bolest kloubů a hyperurikémie [6, 24, 31].

3.8.2 Léčiva druhé linie

STREPTOMYCIN a další aminoglykosidy



Streptomycin byl objeven v roce 1943 Selmanem Waksmanem, Za objev mu byla v roce 1952 udělena Nobelova cena. Streptomycin je první látka, která byla indikována na léčbu tuberkulózy. Získává se ze *Streptomyces griseus*. Působí baktericidně proti extracelulárně umístěným mykobakteriím [1].

Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na ribozomální podjednotku 30S bakterie, čímž znemožní správnou proteosyntézu bílkovin. Ke správné funkci potřebuje bazické pH, při nízkých hodnotách pH pronikání do bakterie omezeně, což může vysvětlovat jeho neúčinnost při monoterapii. Streptomycin spolu s dalšími aminoglykosidy nedokáže vniknout do savčí buňky, a proto ani nepůsobí na intracelulární bakterie. Používají se především v indukční fázi na rychle se množící mykobakterie, na spící formy nepůsobí [33, 34].

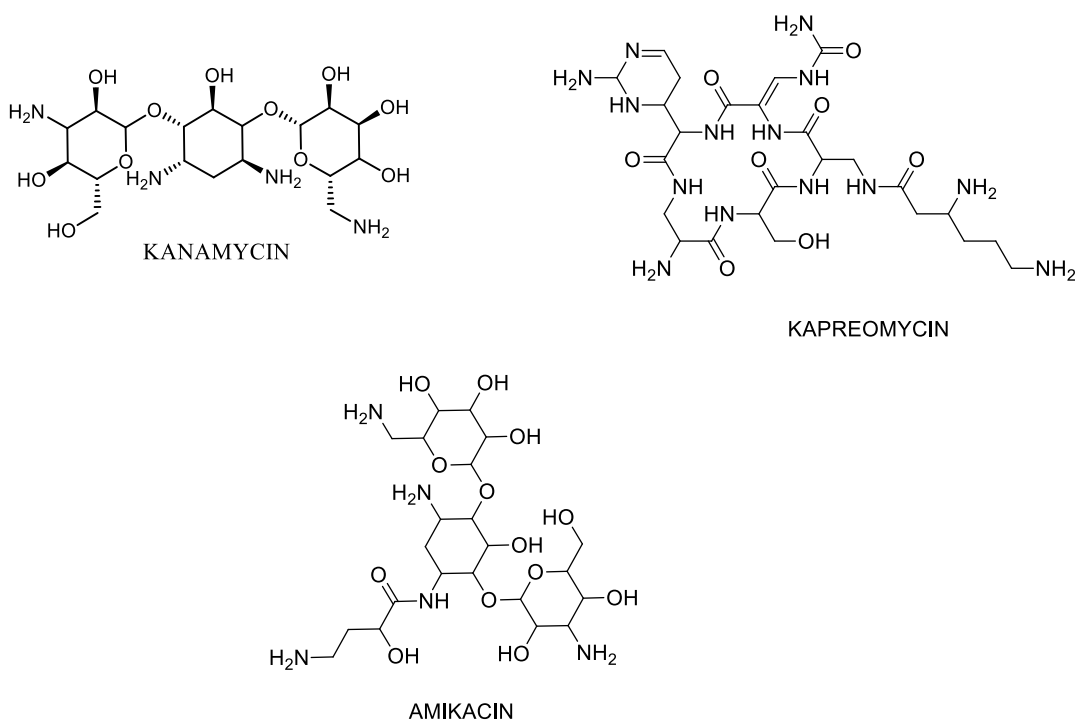
Aminoglykosidy (kanamycin, amikacin) a kapreomycin se podávají pouze v injekční formě intramuskulárně (velmi málo i.v.), z GIT se nevstřebávají. Malé množství látky vylučuje organismus potem, mlékem, slinami, ale největší část se zbavuje prostřednictvím glomerulů v ledvinách [24].

Denně se aplikuje 15 mg/kg i.m., většinou 1 g za den, u jedinců staršího věku je dávka o 0,25 mg/den nižší [4].

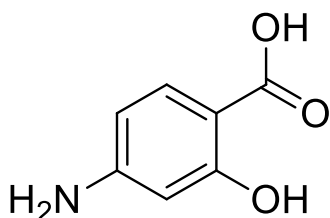
Mezi negativní účinky patří nefrotoxicita a ototoxicita. V porovnání s ostatními aminoglykosidy je streptomycin nejméně nefrotoxický, protože obsahuje malé množství kationtových aminoskupin. Za ototoxicitu je zodpovědné hromadění v endolymfě a perilymfě vnitřního ucha. S vestibulárními potížemi mohou souviset i další vedlejší účinky jako například závratě, nevolnost, ztráta rovnováhy, zvracení. Stejně jako u jiných antibiotik můžeme pozorovat vyrážku, kopřivku a horečku [24, 34].

Rezistence u jednotlivých struktur nejsou stejné, každý se váže na jiné místo v ribozomální podjednotce, a proto vznikají i rozdílné ribozomální mutace. Odolnost na streptomycin se nejvíce vyskytuje v oblastech, kde je velmi využíván i na léčbu jiných bakteriálních onemocnění. Pokud je daný kmen mykobakterie vůči streptomycinu rezistentní, aplikuje se amikacin nebo dražší kapreomycin [34].

Mezi streptomycinem, kanamycinem, amikacinem a kapreomycinem je zkřížená rezistence [1].



KYSELINA *para*-AMINOSALICYLOVÁ, PAS

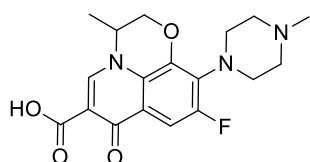


Chemoterapeutikum, které bylo dříve podávané do kombinace proti vzniku rezistence na isoniazid a streptomycin [4]. Mechanismus účinku se neustále studuje, ale s největší pravděpodobností spočívá v inhibici syntézy kyseliny listové, a nebo v zastavení syntézy mykobaktinu, jakožto složky buněčné stěny, a tím se redukuje zpětné

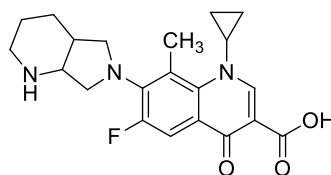
vychytávání železa. Kombinovaná léčba s PAS často vedla k žaludečním obtížím, proto byla později nahrazena lépe tolerovaným ethambutolem [24, 35-36].

Lidský organismus se PAS zbavuje glomerulární filtrací a tubulární sekrecí. Mezi nepříznivě účinky řadíme nechutenství, průjem, nevolnost, zvracení, hypothyerózu (zvláště v kombinaci s ethionamidem), hepatitidu, alergickou horečku, poruchy krvetvorby atd. Opatrné podávání u pacientů s alergií na aspirin [36].

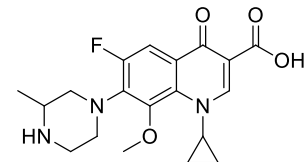
FLUOROCHINOLONY



LEVOFLOXACIN



MOXIFLOXACIN

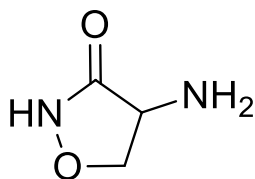


GATIFLOXACIN

Do této skupiny patří levofloxacin, moxifloxacin a gatifloxacin. K terapii tuberkulózy byly přiřazeny v roce 1985 jako rezervní léčiva. Účinek je baktericidní se schopností proniknout ve velké koncentraci do vnitřního buněčného prostředí, to platí i u makrofágů. Nejlepší aktivitu proti mykobakteriím vykazují moxifloxacin a gatifloxacin. Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA gyrasy i topoizomerasy II, která vede k degradaci chromozomu. Po perorálním podání se rychleji vstřebávají do organismu, kdy po jedné až třech hodinách dosahují v plazmě maximální koncentraci. Látky jsou z největší části vylučovány ledvinami tubulární sekrecí a glomerulární filtrací [37].

Z nežádoucích projevů můžeme zaznamenat nevolnost, zvracení, říhání, nechutenství, bolest břicha, průjem, bolest hlavy, kožní vyrážka, zánět šlach a ruptura Achillovy šlachy, prodloužení QT intervalu. Od ostatních léčiv a potravin obsahujících vápník, hořčík, hliník, zinek a železo by měl být odstup alespoň dvě hodiny [37].

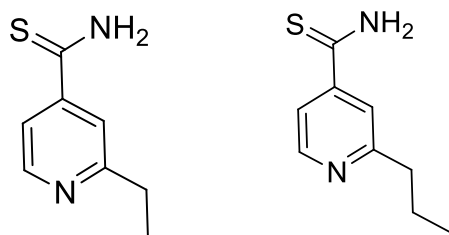
D-CYKLOSERIN



Po chemické stránce je strukturně analogický s aminokyselinou D-alaninem a s tím souvisí i jeho aktivita. Způsobuje deaktivaci enzymů D-alanin-D-alanin-synthetasy. Způsobuje deaktivaci enzymů D-alanin-D-alanin-synthetasy, alanin racemasy a alanin permeasy, které jsou důležité pro tvorbu peptidoglykanu, složky buněčné stěny. Velmi snadno se vstřebává po orálním podání. Ledvinami se v nezměněné formě vylučuje až 70 % látky. V kombinaci s neurotoxickými léky (isoniazid, ethionamid atd.) zaznamenáváme neurologické a psychiatrické nežádoucí účinky. Současné dodávání pyridoxinu snižuje neurotoxické potíže [37].

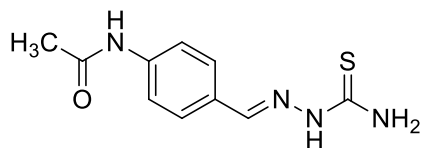
U pacientů užívajících více než 500 mg denně je nutné sledování plazmatické koncentrace. Široce se distribuuje do tělesných tekutin včetně mozkomíšního moku [35].

ETHIONAMID, PROTHIONAMID



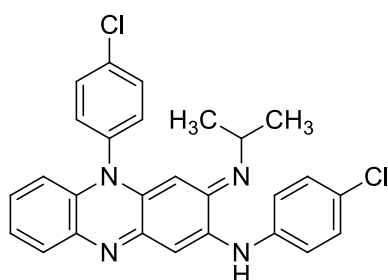
Látky patří do skupiny thioamidů. Mají velmi podobnou strukturu, téměř stejný mechanismus účinku (inhibice syntézy esenciální kyseliny mykolové) i farmakokinetiku [37]. Podávají se perorálně jedenkrát denně (maximálně 1 g/den). Metabolizace probíhá v játrech za vzniku sedmi metabolitů, některé jsou biologicky aktivní. Jedinci s onemocněním jater musí plazmatické hladiny thionamidů neustále kontrolovat. Při současné konzumaci ethionamidu s nadměrným množstvím alkoholu dochází k psychotickým reakcím. Opatrně i u kombinací s antiretroviroty a hepatotoxickými léky [35].

THIACETAZON



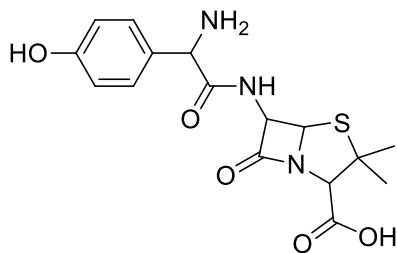
Thiacetazon (TCA), bakteriostatické léčivo používané v chudých zemích ve fixní kombinaci s isoniazidem. Jeho využití je omezené z důvodu nízké účinnosti a toxicity. U HIV-pozitivních pacientů způsobuje vážné kožní problémy jako například Stevens-Johnson syndrom. Mechanismus působení proti mykobakteriím byl dlouhou dobu studován. Nakonec bylo zjištěno, že TAC je proléčivo, které aktivuje mykobakteriální monooxidasu EthA. TAC neinhibuje aktivitu FAS-II (synthasa mastných kyselin), ale nejspíše působí v pozdějším kroku. Jakmile jsou řetězce mastných kyselin prodlouženy pomocí FASII, meromykoláty (mastné kyseliny obsahující přes 50 uhlíkových atomů) v přítomnosti TAC / SRI-224 selžou. Výsledky naznačují, že tyto léky mění biosyntézu kyseliny mykolové inhibicí cyklopropanace meromylátového řetězce [35, 38, 39].

KLOFAZIMIN



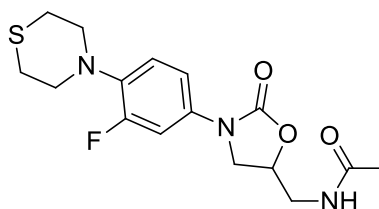
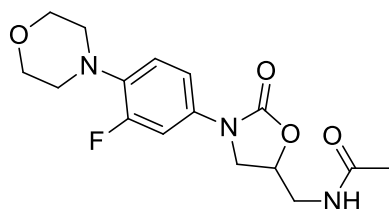
Původně syntetizován na léčbu TB, ale následně využíván především k léčbě lepry. Jeho účinek není úplně známý, ale nejspíše ovlivňuje mykobakteriální DNA a brání její transkripci. Společně s antibakteriálními účinky má i protizánětlivý účinek [35].

AMOXICILIN



Antibiotikum podávané ve vysokých koncentracích spolu s kyselinou klavulánovou ke snížení aktivity beta-laktamas produkovaných mykobakteriemi. Jsou využívány jen v ojedinělých případech [35].

LINEZOLID, SUTEZOLID



Léčivo patří k nově nasyntetizovaným látkám s antimykobakteriální aktivitou ze skupiny oxazolidinonů. Používá se na léčbu MDR-TB. Nežádoucí je nebezpečná toxicita při dlouhodobém užívání. Po perorální nebo intravenózní aplikaci je biologické dostupnost 100 %. Linezolid ovlivňuje enzymy monoaminoxidasu A i B, a proto se nesmí užívat spolu s SSRI a TCA. Metabolizace se uskutečňuje v játrech, oxidací, za vzniku dvou neaktivních metabolitů, které jsou vylučovány močí. U pacientů s cytopénií se musí užívat s velkou opatrností, protože může vyvolat reverzibilní myelosupresi [35].

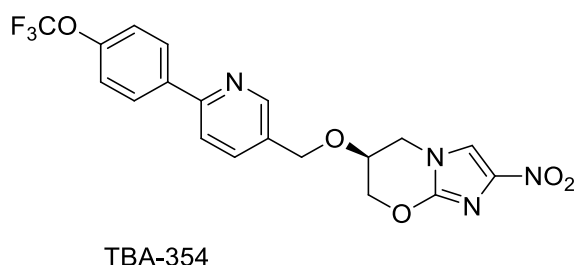
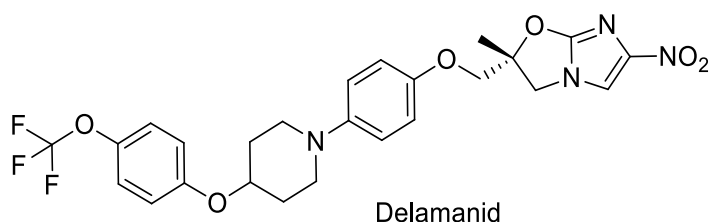
Od ostatních antituberkulotik se liší schopností blokovat část 23S podjednotky 50S ribozomu (centrum peptidyl transferasové aktivity) a bránit tak syntéze důležitých proteinů. Negativně ovlivňuje krvetvorbu, tlumí činnost kostní dřeně a způsobuje neuropatii. Pokud snížíme denní dávku z 1200 mg na 600 mg, omezíme negativní účinky a zároveň se zachová jeho účinnost [40].

Sutezolid je sirným isosterem linezolidu a je bezpečnější, prozatím ve fázi klinického testování [41].

3.8.3 Nová antituberkulotika

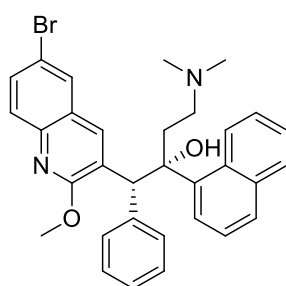
Věda se snaží o objevení nových léčiv, které budou mít nový mechanismus účinku, dobrou snášenlivost, příznivou farmakokinetiku s biologickou dostupností a žádné nebo velmi nízké interakce s ostatními léčivy. Důležitým atributem je jejich aplikace na rezistentní formy nemoci a také možnost kombinace s léky na HIV infekci. Nová antituberkulotika jsou sloučeniny z již známých skupin, ale i úplně nové struktury s novým typem účinku.

Z nitroimidazooxazolových chemoterapeutik sem patří delamanid a pretomanid (PA-824) dříve indikované k terapii anaerobních a parazitárních infekcí. Jsou to proléčiva, přeměnu do aktivní formy způsobují mykobakteriální enzymy. V anaerobním prostředí produkují NO, který má toxický efekt na cytochrom C oxidasu, za aerobních podmínek inhibují syntézu kyseliny mykolové. Na rozdíl od isoniazidu neovlivňují α -mykolové kyseliny. Nežádoucí je riziko prodlužování QT intervalu. Naopak výhodně ovlivňují replikující i nereplikující se bakterie. Další látkou ze stejné skupiny je TBA-354, jejíž vlastnosti jsou prozatím v klinickém testování. Delamanid byl Evropskou lékovou agenturou (EMA), japonským Ministerstvem zdravotnictví a sociální péče a práce povolen k léčbě MDR-TB [42, 43].



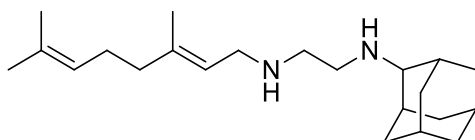
Bedachilin, diarylchinolinové chemoterapeutikum, blokuje ATP syntázu a tím dojde k poklesu hladiny ATP uvnitř buňky. Účinkuje na spící i replikující se

mykobakterie. FDA a EMA schválila bedachilin ke kombinovanému režimu plicní MDR-TB. Testování prokázalo vysokou *in vitro* aktivitu proti izolátům *M. tuberculosis* citlivým a rezistentním na doposud používaná léčiva. Výhodná je jeho selektivita k mykobakteriální ATP synthase (> 20000) v porovnání s eukaryotickou ATP synthasou v mitochondriích. Bedachilin je metabolizován cytochromem P450 3A (CYP3A), současné kombinace s induktory či inhibitory tohoto enzymu mohou způsobit nežádoucí lékové interakce [43]. Bezpečnost bedachilinu se doposud studuje, obavy se vztahují k jeho schopnosti prodlužovat QT interval [40, 44, 45].



Bedachilin

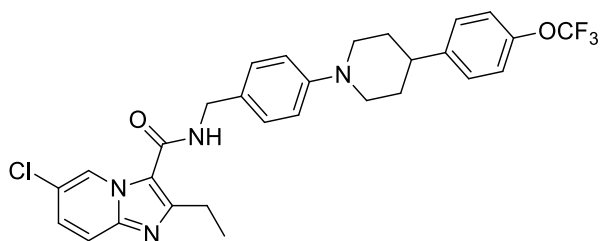
Analog ethambutolu jen s jiným mechanismem účinku je ethylendiamin SQ109. Používá se na kmeny odolné vůči ethambutolu. SQ109 dokáže inhibovat shromažďování mykolové kyseliny do buněčné stěny mykobakterie. V kombinaci s antituberkulotiky první a druhé linie nebyly zaznamenány žádné interakce. Naopak se zjistilo, že bedachilin a SQ109 vykazují synergický efekt. Bedachilin snadněji pronikne přes buněčnou stěnu po aplikaci SQ109, který ji oslabí. Synergický účinek vykazuje i s isoniazidem a rifampicinem. Jeho uplatnění se prozatím klinicky testuje, ale předpokládá se jeho využití při léčbě recidivujících TB, z důvodu mizivé schopnosti mutace [41].



SQ109

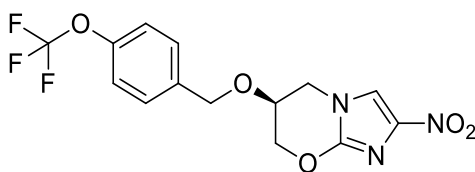
Q203 je stále v procesu testování. Jeho cílem je QcrB podjednotka cytochromu BC1 komplexu mykobakterie. Při testování *in vivo* i *in vitro* prokázalo

vysokou aktivitu proti intracelulárně lokalizovaným mykobakteriím, včetně MDR-TB a XDR-TB. Q203 patří k bezpečným léčivům se schopností zvyšovat baktericidní efekt s minimální patologií. Prozatím nebyly nalezeny žádné lékové interakce [41].



Q203

Studie objevila nový, atraktivní režim, který zvýší účinnost léčby proti citlivým kmenům a MDR-TB. Obsahuje léčiva: pretomanid (PA-824), moxifloxacin a pyrazinamid. Výhoda režimu spočívá ve zkrácení doby terapie z původních osmnácti a více měsíců na devět až dvanáct měsíců [40, 46].



Pretomanid - PA824

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje, metody

Nově připravené látky byly syntetizovány v laboratořích na katedře Farmaceutické chemie a kontrole léčiv (KFCHKL) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Veškeré reagenty a chemikálie pocházejí od společnosti Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), pokud není uvedeno jinak a byly použity v dodané kvalitě. Výchozí látky (5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny) byly obdrženy z laboratoře Dr. Zitka na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

Pro kontrolu průběhu reakcí a čistoty produktů jsem využívala TLC chromatografii. TLC desky Silica 60 F254 byly zakoupeny u společnosti Merck (Darmstadt, Německo).

Chromatografie konečných sloučenin byla prováděna na automatizovaném chromatografu CombiFlash Rf (Teledyne Isco, Lincoln, NE, USA), s použitím kolony naplněné silikagelem Kieselgel 60, 0,040 do 0,063 mm (Merck, Darmstadt, Německo). Sloučeniny byly detekovány za použití UV-VIS detektoru při vlnové délce při 280 nm.

$^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektra byla měřena na spektrometru Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) při frekvenci 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C . Spektra byla zaznamenávána v deuterovaném dimethylsulfoxidu ($\text{DMSO-}d_6$) nebo deuterovaném chloroformu (CDCl_3) při laboratorní teplotě. Chemické posuny δ (ppm) jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) přes referenční signály rozpouštědla ($\text{DMSO-}d_6$ 2,50 ppm v ^1H spektru a 39,70 ppm v ^{13}C spektru; CDCl_3 7,26 ppm v ^1H spektru a 77,0 v ^{13}C spektru).

Infračervená spektra byla zaznamenána pomocí spektrofotometru Nicolet Impact 400 (Nicolet, Madison, WI, USA) za použití metody ATR (zeslabený vnitřní odraz) na germaniovém krystalu.

Elementární analýza u nových sloučenin byla provedena na analyzátoru Micro Cube Element Analyzer (Elementar Analysensysteme, GmbH, Hanau, Německo).

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře pomocí bodotávku Stuart SMP30 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Velká Británie) a nejsou korigovány.

Výtěžky reakcí jsou uvedeny v procentech a uvádí množství chromatograficky čistého produktu po všech čistících krocích.

Pro výpočet hodnot $\log P$ a $\text{Clog } P$ jsem použila program CS ChemBioDraw Ultra verze 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

Chemické vzorce byly rovněž tvořeny v programu CS ChemBioDraw Ultra verze 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

4.2 Výchozí látky - 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny

Příprava výchozích látek vychází z mechanismu Minisciho reakce neboli radikálové alkylace, kdy dochází k radikálové substituci na aromatické jádro (popř. na heterocykl), které má elektronový deficit. Je to výkonná metoda pro syntézu alkyl-aryl skupin. Reakce byla popsána v roce 1971 panem F. Minisci. Typickým příkladem je alkylace mezi pyridinem a pivalovou kyselinou za vzniku 2-*tert*-butylpyridinu v přítomnosti AgNO_3 , H_2SO_4 a peroxodisíranu amonného (schéma 1). Současně probíhá acylace zbytku kyseliny s aromátem za vzniku vedlejšího produktu. Nevýhoda spočívá v nízkém výtěžku v důsledku potřeby náročných oxidačních podmínek. Řešením může být použití radikálových prekurzorů jako např. trifluoroborité soli, ZnS , peroxidů, H_3BO_3 , α -ketokyselin, jodidů atd. [47, 48].

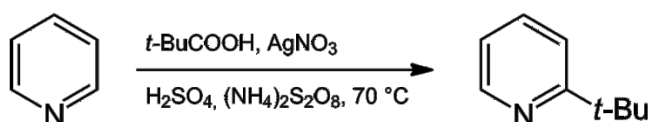


Schéma 1: Reakce pyridinu s pivalovou kyselinou

Mechanismem reakce je vznik volného radikálu oxidativní dekarboxylací karboxylové kyseliny v přítomnosti stříbrné soli a oxidačního činidla. Oxidační činidlo reoxiduje stříbrnou sůl a radikál alkyluje aromatické jádro do příslušné polohy (schéma 2). Podobnou reakcí je Friedel-Craftsova alkylace, ale s jinou reaktivitou a selektivitou [48, 49].

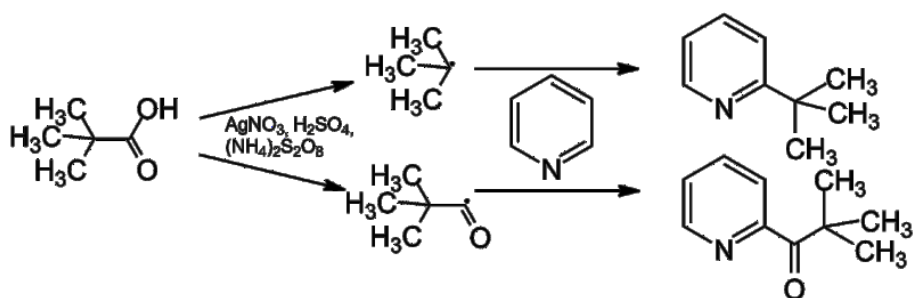


Schéma 2: Mechanismus Minisciho reakce

Jako výchozí látky pro tuto DP byly použity 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny s různě dlouhým alkylovým řetězcem dříve připravené v naší laboratoři. Tyto kyseliny byly připraveny radikálovou alkylací komerčně dostupného pyrazin-2-karbonitrilu (Sigma-Aldrich) a následnou bazicky katalyzovanou hydrolýzou na odpovídající kyselinu (schéma 3). Reakční podmínky a způsob provedení alkylace jsou podrobně popsány v článku Kučerové a spol. [49].

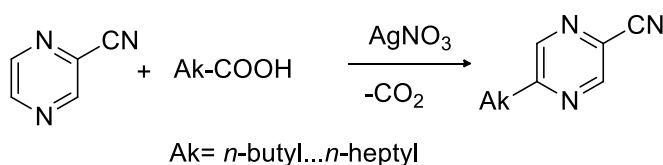


Schéma 3: Obecné reakční schéma alkylace pyrazin-2-karbonitrilu

V druhé reakci je 5-alkylpyrazin-2-karbonitril hydrolyzován vodným roztokem NaOH a následně okyselen HCl za vzniku 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny (schéma 4).

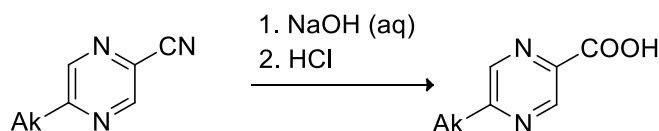


Schéma 4: Obecné reakční schéma přípravy výchozích látek

4.3 Příprava produktu: deriváty 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů

Reakce mezi karboxylovou kyselinou a aminem probíhá za normálních podmínek obtížně, proto se do reakční směsi přidává CDI (karbonyldiimidazol) tzv. couplingové činidlo, které aktivuje karboxylovou kyselinu (hydroxyl se převede na dobře odstupující skupinu) a dojde k acylaci aminoskupiny (schéma 5). CDI usnadňuje vznik amidové vazby. Mechanismus reakce se často využívá při syntéze proteinů [50].

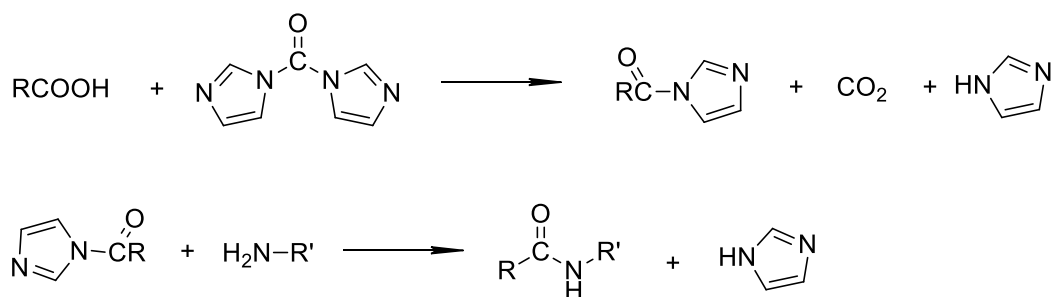


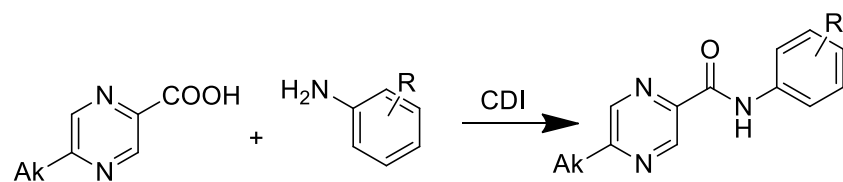
Schéma 5: Princip couplingové reakce po aktivaci CDI [51]

Příprava produktů probíhala reakcí derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny s příslušně substituovaným anilinem v přítomnosti CDI za vzniku amidové vazby mezi dvěma aromáty (schéma 6). Aromatický kruh kyseliny je v poloze 5 substituován různě dlouhými alkylovými řetězci. Z derivátů anilínu jsme použili sloučeniny se substituenty Cl, CF₃ a OH umístěných v polohách 2, 3, a 4 na benzenovém jádře. Finální produkty se liší substituenty v poloze 5 pyrazinového kruhu a jednotlivými substituenty na benzenovém kruhu.

4.3.1 Obecný (typický) postup přípravy 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů

Výchozí látka, tj. příslušná 5-alkylpyrazin-2-karboxylová kyselina (1 mmol) byla v baňce s kulatým dnem smíchána s 1,1'-karbonyldiimidazolem (CDI) (305 mg, 1,9 mmol, 1,9 ekv.) a dimethylsulfoxidem (DMSO) (1 ml). Baňka s reagujícími látkami se přikryla folií a nechala se 15–20 minut za stálého míchání probíhat reakce. V baňce bylo vidět a slyšet šumění bublinek v důsledku uvolňování CO₂ po rozpadu karboxylu. Po odeznění šumění byl přidán příslušný anilín (1 mmol, 1 ekv.). Poté se směs míchala po dobu asi 12 hodin za laboratorní teploty. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC analýzy s mobilní fází tvořenou směsí hexanu a ethylacetátu (EtOAc) v poměru 2:1.

V dalším kroku byl obsah baňky zředěn přibližně 10 ml destilované vody, čímž došlo k vysrážení pevného podílu. Směs byla poté vytřepávána do EtOAc (3×20 ml). Spojené organické podíly byly vysušeny nad bezvodým síranem sodným. K roztoku bylo přidáno malé množství mořského písku a jedna čajová lžička silikagelu. Přebytečný EtOAc byl odpařen za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Reakční směs adsorbovaná na silikagel byla podrobena separaci pomocí flash chromatografu CombiFlash® Rf. Mobilní fází tvořil hexan a EtOAc, monitorovací vlnová délka 260 nm, detekční vlnová délka 280 nm, průtoková rychlost mobilní fáze 35 ml/min. Gradientová eluce byla v rozmezí 0–20 % EtOAc v hexanu. Na základě záznamu z flash chromatografu byly vybrány zkumavky s produktem a poté byla provedena kontrola čistoty látek TLC chromatografií. Obsahy daných zkumavek byly slity do varné baňky a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. V případě barevného znečištění produktu byl produkt v malé baňce převrstven malým množstvím hexanu a byl vložen proužek filtračního papíru, který nečistotu absorboval. Finální produkty byly podrobeny standardní charakterizaci. Obecný princip přípravy je znázorněno na schématu 6.



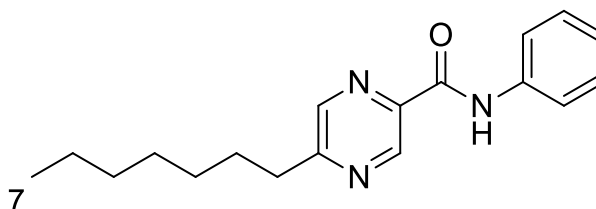
Ak= *n*-butyl,... *n*-heptyl

R= H, 4-CH₃, 2-Cl, 3-CF₃, 4-OH

Schéma 6: Obecné reakční schéma přípravy konečných produktů

4.4 Nově připravené sloučeniny

MH1 – *N*-fenyl-5-heptylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₈H₂₃N₃O

Molekulová hmotnost: 297,39

Log *P*: 3,87

CLog *P*: 5,13748

Teplota tání: 106,9–107,7 °C

Teoretický výtěžek reakce: 297,4 mg

Praktický výtěžek reakce: 174,3 mg (59 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 72,20 %, H 7,80 %, N 14,13 %

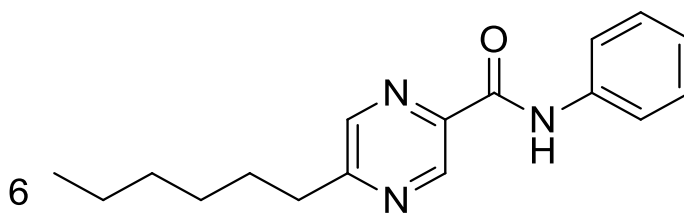
Nalezeno: C 72,75 %, H 7,83 %, N 14,08 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.64 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.42 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H6), 7.80–7.73 (m, 2H, H2', H6'), 7.43–7.35 (m, 2H, H3', H5'), 7.20–7.13 (m, 1H, H4'), 2.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.45–1.23 (m, 8H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.3, 161.0, 143.7, 141.8, 137.4, 129.1, 124.6, 119.7, 35.7, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 22.6, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3346 (ν(NH), amid), 2957, 2933, 2850 (ν(CH), alkyl), 1670 (ν(C=O), amid), 1522, 1443, 1155, 1035, 752, 691, 676

MH2 – *N*-fenyl-5-hexylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₇H₂₁N₃O

Molekulová hmotnost: 283,37 mg

Log *P*: 3,45

CLog *P*: 4,60848

Teplota tání: 118,6–120,0 °C

Teoretický výtěžek reakce: 238,38 mg

Praktický výtěžek reakce: 165 mg (58 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 72,06 %, H 7,47 %, N 14,83 %

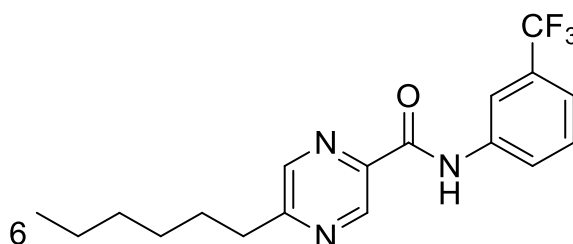
Nalezeno: C 72,32 %, H 7,45 %, N 14,85 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.64 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.43 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H6), 7.80–7.73 (m, 2H, H2', H6'), 7.44–7.37 (m, 2H, H3', H5'), 7.20–7.15 (m, 1H, H4'), 2.92 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.45–1.27 (m, 6H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.3, 161.0, 143.7, 141.8, 137.4, 129.1, 124.6, 119.7, 35.7, 31.5, 29.3, 28.9, 22.5, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3344 (ν(NH), amid), 2948, 2932, 2854 (ν(CH), alkyl), 1670 (ν(C=O), amid), 1523, 1443, 1157, 1036, 752, 691, 677

MH4 - 5-hexyl-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₈H₂₀F₃N₃O

Molekulová hmotnost: 351,37

Log *P*: 4,37

CLog *P*: 5,5467

Teplota tání: 64,0–64,9 °C

Teoretický výtěžek reakce: 351,16 mg

Praktický výtěžek reakce: 156 mg (44 %)

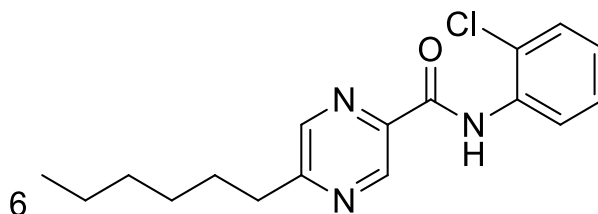
Elementární analýza: není k dispozici, čistota bude dodatečně hodnocena pomocí HPLC-MS či HRMS

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₃), 8.43 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₆), 8.06 (bs, 1H, H₂'), 7.97 (dd, *J* = 2.1, 8.2 Hz, 1H, H₄'), 7.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₅'), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₆'), 2.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.85–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.44–1.27 (m, 6H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.8, 161.3, 143.8, 141.9, 141.3, 137.9, 131.56 (q, *J* = 32.5 Hz), 129.7, 123.8 (q, *J* = 272.3 Hz), 121.11 (q, *J* = 3.9 Hz), 116.46 (q, *J* = 3.9 Hz), 35.7, 31.5, 29.2, 28.9, 22.5, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3349 (ν(NH), amid), 2931, 2856 (ν(CH), alkyl), 1689 (ν(C=O), amid), 1544, 1450, 1337, 1322, 1166, 1122, 1070, 1032, 902, 799, 698, 661

MH5 – 5-hexyl-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₇H₂₀ClN₃O

Molekulová hmotnost: 317,81

Log *P*: 4,01

CLog *P*: 4,50304

Teplota tání: 84,3–84,5 °C

Teoretický výtěžek reakce: 317,13 mg

Praktický výtěžek reakce: 180 mg (57 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 64,25 %, H 6,34 %, N 13,22 %

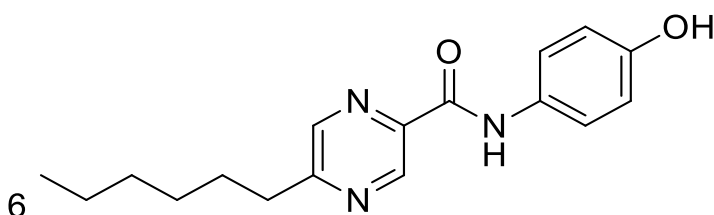
Nalezeno: C 64,66 %, H 6,39 %, N 13,01 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.33 (bs, 1H, CONH), 9.39 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.63 (dd, *J* = 1.5, 8.3 Hz, 1H, H6'), 8.48 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H6), 7.43 (dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, 1H, H3'), 7.37–7.32 (m, 1H, H5'), 7.12–7.07 (m, 1H, H4'), 2.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.76 (m, 2H, CH₂), 1.44–1.27 (m, 6H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.5, 161.2, 143.7, 142.1, 141.8, 134.4, 129.2, 127.8, 124.9, 123.4, 121.1, 35.7, 31.5, 29.2, 28.9, 22.5, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3338 (ν(NH), amid), 2952, 2931, 2854 (ν(CH), alkyl), 1693 (ν(C=O), amid), 1594, 1536, 1442, 1307, 1032, 754, 676

MH7 – 5-hexyl-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxymid



Sumární vzorec: C₁₇H₂₁N₃O₂

Molekulová hmotnost: 299,37

Log *P*: 3,06

CLog *P*: 3,94148

Teplota tání: 141,0–141,5 °C

Teoretický výtěžek reakce: 149,70 mg (vycházelo se z 0,5 mmol výchozí kys.)

Praktický výtěžek reakce: 75 mg (50 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 68,20 %, H 7,07 %, N 14,04 %

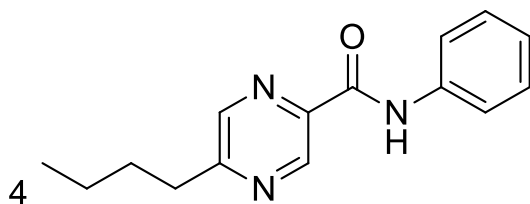
Nalezeno: C 68,43 %, H 7,13 %, N 13,91 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.40 (s, 1H, CONH), 9.31 (bs, 1H, OH), 9.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.66 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.68–7.61 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 6.78–6.70 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.76–1.66 (m, 2H, CH₂), 1.34–1.22 (m, 6H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.3, 160.5, 154.2, 143.1, 143.0, 142.6, 130.0, 122.3, 115.2, 34.8, 31.2, 28.7, 28.4, 22.1, 14.1.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3369, 3336 (ν(NH), amid), 2958, 2927, 2852 (ν(CH), alkyl), 1657 (ν(C=O), amid), 1520, 1448, 1251, 1030, 834, 684

MH8 – 5-butyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₅H₁₇N₃O

Molekulová hmotnost: 255,31

Log *P*: 2,61

CLog *P*: 3,55048

Teplota tání: 120,5–120,9 °C

Teoretický výtěžek reakce: 255,14 mg

Praktický výtěžek reakce: 58,8 mg (23 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 70,56 %, H 6,71 %, N 16,46 %

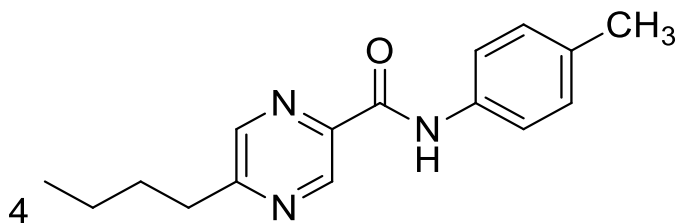
Nalezeno: C 70,55 %, H 6,74 %, N 16,30 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.64 (s, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.43 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.80–7.73 (m, 2H, H2', H6'), 7.44–7.36 (m, 2H, H3', H5'), 7.21–7.14 (m, 1H, H4'), 2.93 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.74 (m, 2H, CH₂), 1.49–1.37 (m, 2H, CH₂), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.3, 161.0, 143.7, 141.8, 137.4, 129.1, 124.6, 119.7, 35.4, 31.4, 22.4, 13.8.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3339 (ν(NH), amid), 2964, 2948, 2935, 2868 (ν(CH), alkyl), 1673 (ν(C=O), amid), 1521, 1442, 1159, 1036, 752, 691, 677

MH9 – 5-butyl-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₆H₁₉N₃O

Molekulová hmotnost: 269,35

Log *P*: 3,1

CLog *P*: 4,04948

Teplota tání: 126,9–127,1 °C

Teoretický výtěžek reakce: 269,35 mg

Praktický výtěžek reakce: 60 mg (22 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 71,35 %, H 7,11 %, N 15,60 %

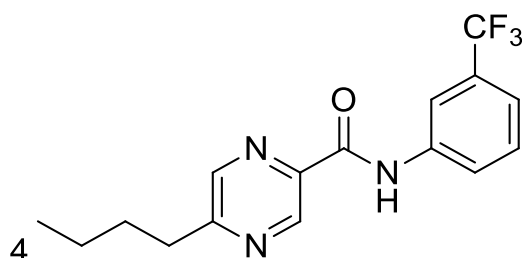
Nalezeno: C 71,56 %, H 7,15 %, N 15,55 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.58 (bs, 1H, CONH), 9.39 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.42 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.68–7.61 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 7.23–7.17 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 2.36 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.83–1.73 (m, 2H, CH₂), 1.48–1.37 (m, 2H, CH₂), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.1, 160.9, 143.6, 141.9, 141.8, 134.8, 134.3, 129.6, 119.7, 35.4, 31.4, 22.4, 20.9, 13.8.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3346 (ν(NH), amid), 2954, 2931, 2871 (ν(CH), alkyl), 1670 (ν(C=O), amid), 1518, 1320, 1030, 819, 674

MH10 – 5-butyl-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₆H₁₆F₃N₃O

Molekulová hmotnost: 323,31

Log *P*: 3,54

CLog *P*: 4,4887

Teplota tání: 67,9–68,3 °C

Teoretický výtěžek reakce: 323,12 mg

Praktický výtěžek reakce: 65 mg (20 %)

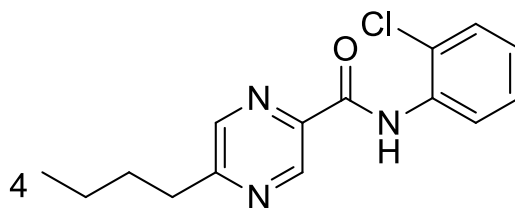
Elementární analýza: není k dispozici, čistota bude dodatečně hodnocena pomocí HPLC-MS či HRMS

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.44 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 8.06 (bs, 1H, H2'), 8.00–7.94 (m, 1H, H4'), 7.51 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5'), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6'), 2.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.74 (m, 2H, CH₂), 1.49–1.37 (m, 2H, CH₂), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.8, 161.3, 143.8, 141.9, 141.3, 137.9, 131.55 (q, *J* = 32.6 Hz), 129.7, 123.79 (t, *J* = 274.6 Hz), 121.11 (q, *J* = 3.9 Hz), 116.45 (q, *J* = 4.0 Hz), 35.4, 31.3, 22.4, 13.8.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3360 (ν(NH), amid), 2958, 2929, 2872 (ν(CH), alkyl), 1688 (ν(C=O), amid), 1539, 1448, 1338, 1321, 1167, 1122, 1071, 1033, 901, 790, 697, 660

MH11 – 5-butyl-*N*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₅H₁₆ClN₃O

Molekulová hmotnost: 289,76

Log *P*: 3,17

CLog *P*: 3,44504

Teplota tání: 74,2–74,8 °C

Teoretický výtěžek reakce: 289,76 mg

Praktický výtěžek reakce: 53 mg (18 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 62,18 %, H 5,57 %, N 14,50 %

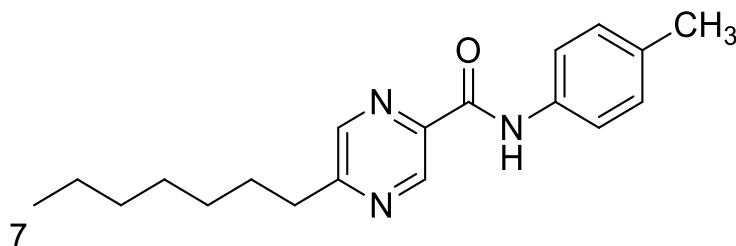
Nalezeno: C 61,95 %, H 5,37 %, N 14,10 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.33 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 8.63 (dd, *J* = 1.6, 8.3 Hz, 1H, H6'), 8.49 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 7.44 (dd, *J* = 1.5, 8.1 Hz, 1H, H3'), 7.38–7.32 (m, 1H, H5'), 7.14–7.07 (m, 1H, H4'), 2.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.49–1.38 (m, 2H, CH₂), 0.98 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.6, 161.2, 143.7, 142.2, 141.8, 134.4, 129.2, 127.8, 124.9, 123.4, 121.2, 35.4, 31.4, 22.4, 13.8.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3336 (ν(NH), amid), 2963, 2932, 2872 (ν(CH), alkyl), 1693 (ν(C=O), amid), 1593, 1533, 1442, 1306, 1032, 755, 677

MH12 – 5-heptyl-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₉H₂₅N₃O

Molekulová hmotnost: 311,42

Log *P*: 4,35

CLog *P*: 5,63648

Teplota tání: 120,5–121,3 °C

Teoretický výtěžek reakce: 622,86 mg (vycházelo se ze 2 mmol výchozí kys.)

Praktický výtěžek reakce: 82,2 mg (13 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 73,28 %, H 8,09 %, N 13,49 %

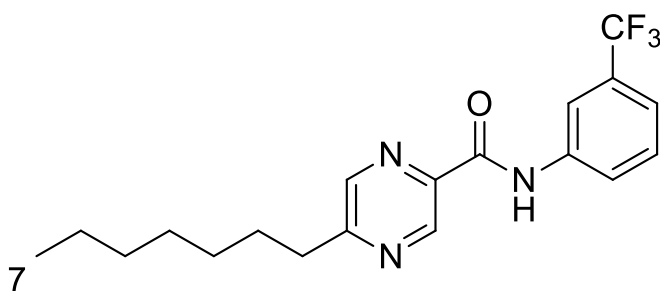
Nalezeno: C **60,22** %, H **6,66** %, N **10,80** % (pozn. nedostatečná čistota)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.59 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.42 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.68–7.61 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 7.22–7.18 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.92 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 2.36 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.85–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.46–1.21 (m, 8H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.2, 160.9, 143.7, 141.9, 141.8, 134.9, 134.3, 129.6, 119.7, 35.7, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 22.6, 20.9, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3344 (ν(NH), amid), 2930, 2851 (ν(CH), alkyl), 1670 (ν(C=O), amid), 1522, 1156, 1035, 813, 680

MH13 – 5-heptyl-*N*-[3-(trifluormethyl)fenyl]pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₉H₂₂F₃N₃O

Molekulová hmotnost: 365,39

Log *P*: 4,79

CLog *P*: 6,0757

Teplota tání: 59,1–60,1 °C

Teoretický výtěžek reakce: 730,34 mg (vycházelo se ze 2 mmol výchozí kys.)

Praktický výtěžek reakce: 64 mg (9 %)

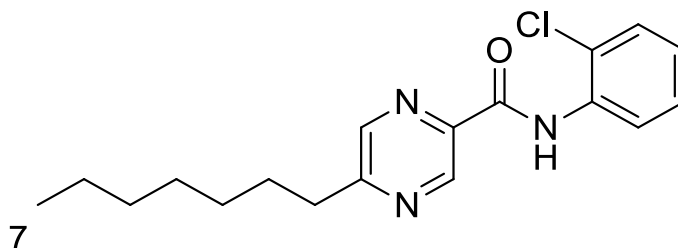
Elementární analýza: není k dispozici, čistota bude dodatečně hodnocena pomocí HPLC-MS či HRMS

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.43 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 8.06 (bs, 1H, H2'), 7.97 (dd, *J* = 2.0, 8.3 Hz, 1H, H4'), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5'), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6'), 2.93 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 1.84–1.75 (m, 2H, CH₂), 1.44–1.22 (m, 8H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.8, 161.3, 143.8, 141.9, 141.3, 137.9, 131.55 (q, *J* = 32.4 Hz), 129.7, 123.80 (q, *J* = 272.9 Hz), 121.11 (q, *J* = 3.8 Hz), 116.45 (q, *J* = 4.0 Hz), 35.7, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 22.6, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3357 (ν(NH), amid), 2930, 2858 (ν(CH), alkyl), 1688 (ν(C=O), amid), 1541, 1449, 1337, 1322, 1163, 1122, 1072, 1033, 903, 791, 698, 660

MH14 – 5-heptyl-N-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₈H₂₂ClN₃O

Molekulová hmotnost: 331,84

Log *P*: 4,42

CLog *P*: 5,03204

Teplota tání: 86,9–87,8 °C

Teoretický výtěžek reakce: 662,3 mg (vycházelo se ze 2 mmol výchozí kys.)

Praktický výtěžek reakce: 36 mg (5 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 65,15 %, H 6,68 %, N 12,66 %

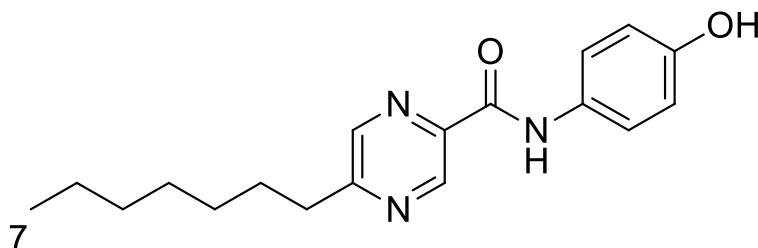
Nalezeno: C **58,01 %**, H **5,81 %**, N **11,24 %** (pozn. nedostatečná čistota)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.34 (bs, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₃), 8.64 (dd, *J* = 1.6, 8.3 Hz, 1H, H_{6'}), 8.49 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.44 (dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, 1H, H_{3'}), 7.38–7.33 (m, 1H, H_{5'}), 7.13–7.08 (m, 1H, H_{4'}), 2.94 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.85–1.76 (m, 2H, CH₂), 1.45–1.22 (m, 8H, CH₂), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.6, 161.2, 143.7, 142.2, 141.8, 134.4, 129.2, 127.8, 124.9, 123.4, 121.2, 35.8, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 22.6, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3336 (ν(NH), amid), 2953, 2930, 2854 (ν(CH), alkyl), 1693 (ν(C=O), amid), 1594, 1533, 1442, 1307, 1032, 755, 678

MH15 – 5-heptyl-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₈H₂₃N₃O₂

Molekulová hmotnost: 313,39

Log *P*: 3,48

CLog *P*: 4,47048

Teplota tání: 139,5–140,1 °C

Teoretický výtěžek reakce: 626,8 mg (vycházelo se ze 2 mmol výchozí kys.)

Praktický výtěžek reakce: 132,1 mg (21 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 68,98 %, H 7,40 %, N 13,41 %

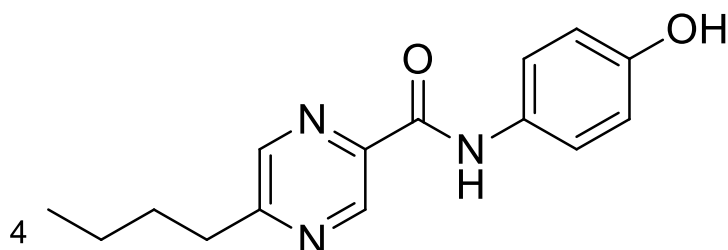
Nalezeno: C 69,55 %, H 7,36 %, N 13,51 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (s, 1H, CONH), 9.38 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.43 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H5), 7.60–7.53 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 6.90–6.83 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 6.38 (bs, 1H, OH), 2.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.83–1.73 (m, 2H, CH₂), 1.43–1.23 (m, 8H, CH₂), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.2, 161.0, 153.3, 143.5, 142.0, 141.9, 130.0, 122.0, 115.9, 35.6, 31.7, 29.3, 29.2, 29.0, 22.6, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3367, 3335 (ν(NH), amid), 2928, 2852 (ν(CH), alkyl), 1658 (ν(C=O), amid), 1521, 1447, 1252, 1029, 835, 687

MH16 – 5-butyl-*N*-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₅H₁₇N₃O₂

Molekulová hmotnost: 271,31

Log *P*: 2,22

CLog *P*: 2,88348

Teplota tání: 154,1-155,5 °C

Teoretický výtěžek reakce: 271,32 mg

Praktický výtěžek reakce: 85,0 mg (31 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 66,40 %, H 6,32 %, N 15,49 %

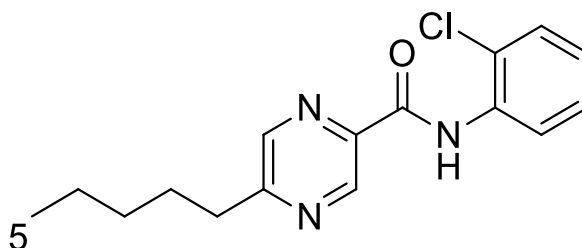
Nalezeno: C 66,71 %, H 6,27 %, N 15,54 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.40 (s, 1H, CONH), 9.31 (s, 1H, OH), 9.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.65 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.69–7.61 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 6.79–6.71 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.88 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.75–1.65 (m, 2H, CH₂), 1.39–1.27 (m, 2H, CH₂), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.3, 160.5, 154.2, 143.1, 143.0, 142.6, 130.0, 122.3, 115.2, 34.5, 30.9, 21.9, 13.9.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3337 (ν(NH), amid), 2957, 2932, 2871 (ν(CH), alkyl), 1661 (ν(C=O), amid), 1520, 1440, 1250, 1227, 1036, 829, 675

MH17 – N-(2-chlorfenyl)-5-pentylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₆H₁₈ClN₃O

Molekulová hmotnost: 303,79

Log *P*: 3,59

CLog *P*: 3,97404

Teplota tání: 80,1-80,2 °C

Teoretický výtěžek reakce: 303,79 mg

Praktický výtěžek reakce: 51,0 mg (16 %) - opakovaná flash chromatografie

Elementární analýza:

Vypočteno: C 63,26 %, H 5,97 %, N 13,83 %

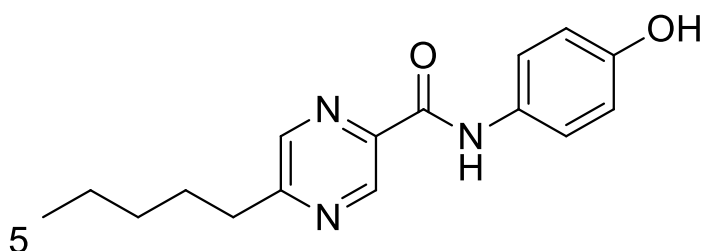
Nalezeno: C 63,88 %, H 6,05 %, N 13,54 %

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 10.33 (s, 1H, CONH), 9.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.64 (dd, *J* = 1.5, 8.2 Hz, 1H, H6'), 8.48 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H6), 7.43 (dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz, 1H, H3'), 7.38–7.32 (m, 1H, H5'), 7.13–7.07 (m, 1H, H4'), 2.93 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.86–1.76 (m, 2H, CH₂), 1.43–1.34 (m, 4H, CH₂), 0.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.5, 161.2, 143.7, 142.1, 141.8, 134.4, 129.2, 127.8, 124.9, 123.4, 121.1, 35.7, 31.4, 28.9, 22.4, 13.9.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3336 (ν(NH), amid), 2963, 2933, 2857 (ν(CH), alkyl), 1693 (ν(C=O), amid), 1593, 1527, 1442, 1308, 1032, 755, 677

MH18 – N-(4-hydroxyfenyl)-5-pentylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₆H₁₉N₃O₂

Molekulová hmotnost: 285,35

Log *P*: 2,46

CLog *P*: 3,41248

Teplota tání: 136,5-136,7 °C

Teoretický výtěžek reakce: 285,35 mg

Praktický výtěžek reakce: 91,5 mg (32 %)

Elementární analýza:

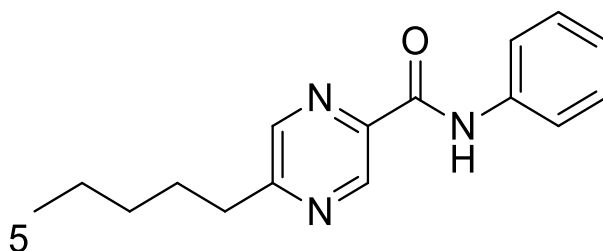
Vypočteno: C 67,35 %, H 6,71 %, N 14,73 %

Nalezeno: C 67,79 %, H 6,67 %, N 14,62 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.39 (s, 1H, CONH), 9.29 (s, 1H, OH), 9.15 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H3), 8.65 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.67–7.62 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 6.77–6.72 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.87 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.76–1.67 (m, 2H, CH₂), 1.36–1.24 (m, 4H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.3, 160.5, 154.2, 143.1, 143.0, 142.5, 130.0, 122.3, 115.2, 34.7, 31.0, 28.4, 22.0, 14.0.

JZ186 – 5-pentyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₆H₁₉N₃O

Molekulová hmotnost: 269,34

Log *P*: 3,03

CLog *P*: 4,07948

Teplota tání: 112,7–113,5 °C

Teoretický výtěžek reakce: 269,3 mg

Praktický výtěžek reakce: 189 mg (70 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 71,35 %, H 7,11 %, N 15,60 %

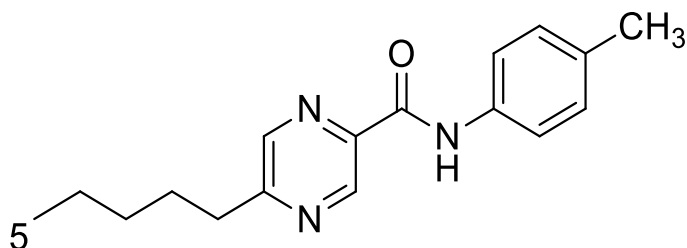
Nalezeno: C 71,84 %, H 7,07 %, N 15,75 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.61 (s, 1H, CONH), 9.18 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₃), 8.68 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₆), 7.92–7.84 (m, 2H, H₂' , H₆'), 7.39–7.30 (m, 2H, H₃' . H₅'), 7.16–7.07 (m, 1H, H₄'), 2.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 1.77–1.67 (m, 2H, CH₂), 1.37–1.24 (m, 4H, CH₂), 0.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.9, 160.7, 143.3, 142.8, 142.6, 138.4, 128.8, 124.2, 120.6, 34.7, 31.0, 28.4, 22.0, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3346 (ν(NH), amid), 2961, 2932, 2871 (ν(CH), alkyl), 1673 (ν(C=O), amid), 1532, 1445, 1030, 753, 691, 671

JZ189 – 5-pentyl-*N*-(*p*-tolyl)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₇H₂₁N₃O

Molekulová hmotnost: 283,37

Log *P*: 3,52

CLog*P*: 4,57848

Teplota tání: 115,5–117,7 °C

Teoretický výtěžek reakce: 283,4 mg

Praktický výtěžek reakce: 194 mg (68 %)

Elementární analýza:

Vypočteno: C 72,06 %, H 7,47 %, N 14,83 %

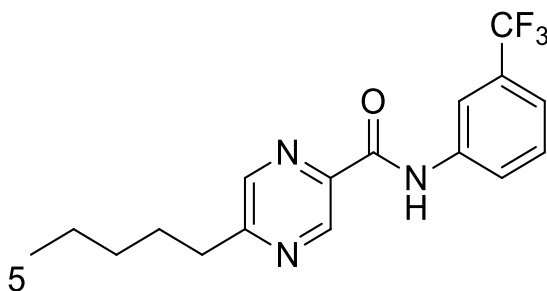
Nalezeno: C 72,31 %, H 7,66 %, N 14,94 %

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (s, 1H, CONH), 9.17 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H3), 8.68 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H6), 7.79–7.73 (m, 2H, AA', BB', H2', H6'), 7.19–7.13 (m, 2H, AA', BB', H3', H5'), 2.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 2.28 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.78–1.68 (m, 2H, CH₂), 1.38–1.24 (m, 4H, CH₂), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.7, 160.6, 143.2, 142.9, 142.6, 135.9, 133.3, 129.2, 120.6, 34.7, 31.0, 28.4, 22.0, 20.7, 14.0.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3343 (ν(NH), amid), 2960, 2931, 2854 (ν(CH), alkyl), 1667 (ν(C=O), amid), 1515, 1317, 1157, 1034, 813, 677

JZ190 – 5-pentyl-N-[3-(trifluormethyl)fenyl]pyrazine-2-karboxamid



Sumární vzorec: C₁₇H₁₈F₃N₃O

Molekulová hmotnost: 337,34

Log *P*: 3,95

CLog *P*: 5,0177

Teplota tání: 70,1–70,9 °C

Teoretický výtěžek reakce: 337,3 mg

Praktický výtěžek reakce: 68 mg (20 %)

Elementární analýza: není k dispozici, čistota bude dodatečně hodnocena pomocí HPLC-MS či HRMS

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.77 (s, 1H, CONH), 9.40 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H₃), 8.43 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H₆), 8.06 (bs, 1H, H₂'), 7.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₄'), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₅'), 7.42 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₆'), 2.93 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂), 1.86–1.76 (m, 2H, CH₂), 1.43–1.33 (m, 4H, CH₂), 0.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 161.8, 161.3, 143.8, 141.9, 141.3, 137.9, 131.55 (q, *J* = 32.6 Hz), 129.7, 123.79 (q, *J* = 272.7 Hz), 121.10 (q, *J* = 3.8 Hz), 116.45 (q, *J* = 4.0 Hz), 35.7, 31.4, 28.9, 22.4, 13.9.

IČ (ATR-Ge, cm⁻¹): 3348 (ν(NH), amid), 2955, 2930, 2861 (ν(CH), alkyl), 1688 (ν(C=O), amid), 1545, 1450, 1337, 1322, 1166, 1122, 1070, 1032, 900, 791, 698, 660

4.5 Výsledky biologického hodnocení

4.5.1 Antimykobakteriální aktivita

Všech 19 látek bylo testováno *in vitro* na účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294), *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 (ATCC 12478), *Mycobacterium avium* ssp. *avium* CNCTC My 80/72 (ATCC 15769), a *Mycobacterium smegmatis* CCM 4622 (ATCC 607). Kmeny *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium* byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Praha. Kmen *M. smegmatis* byl zakoupen z České sbírky mikroorganismů při Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, Brno (CCM).

Antimykobakteriální aktivita (kromě aktivity na *M. smegmatis*) byla testována ve Fakultní nemocnici v Hradci králové. Růstové médium tvořil bujón Middlebrook 7H9 s růstovým doplňkem AODC (albumin, kyselina olejová, dextrosa a katalasa), dodané firmou Sigma-Aldich. Médium mělo deklarovanou hodnotu pH 6,6. K pozitivní kontrole inhibice růstu byl použit isoniazid, negativní kontrolu růstu mykobakterií poskytla živná půda s DMSO (dimethylsulfoxid). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním. Koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 100 – 50 – 12,5 – 6,25 – 3,13 – 1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledná koncentrace DMSO v jamkách nepřekročila 1 % (v/v) a neovlivňovala růst mykobaktérií. Po uplynutí doby pěti dnů byl přidán roztok Almar Blue. Následně byly odečteny výsledky a stanovena MIC (minimální inhibiční koncentrace) v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MIC je definována jako vizuálně zjištěná nejnižší koncentrace testované látky, která zbránila změně modrého zbarvení na růžové.

Aktivita na *M. smegmatis* byla zkoumána PharmDr. Ondřejem Jandourkem, Ph.D. v laboratořích Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovým ředěním. Koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,625 - 7,81 a 3,91 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako

standards se použily ciprofloxacin a rifampicin, jejichž koncentrace se byly 12,5 - 6,25 - 3,125 - 1,56 - 0,78 - 0,39 - 0,195 a 0,098 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledná koncentrace DMSO v jamkách nepřekročila 2,5 % (v/v) a neovlivňovala růst *M. smegmatis*. Mikrotitrační destičky byly utěsněny folií z polyesterenu, poté byly staticky inkubovány bez přístupu světla při teplotě 37 °C. Po uplynutí 48 hodin se přidal roztok Alamar blue s polysorbátem 80 (Sigma-Aldrich, Steiheim, Německo). Následně byly odečteny výsledky a zaznamenána MIC (minimální inhibiční koncentrace) v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. MIC je definována jako vizuálně zjištěná nejnižší koncentrace testované látky, která zbránila změně modrého zbarvení na růžové.

Tabulka č. 1: Antimykobakteriální aktivita *in vitro* nových látek vůči *M. tuberculosis* H37Rv vyjádřená jako MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

	H	4-CH ₃	3-CF ₃	2-Cl	4-OH
butyl	25	25	12,5	100	100
pentyl	25	6,25	3,13	>100	6,25
hexyl	6,25	n.t.	12,5	12,5	6,25
heptyl	6,25	25	6,25	6,25	3,13

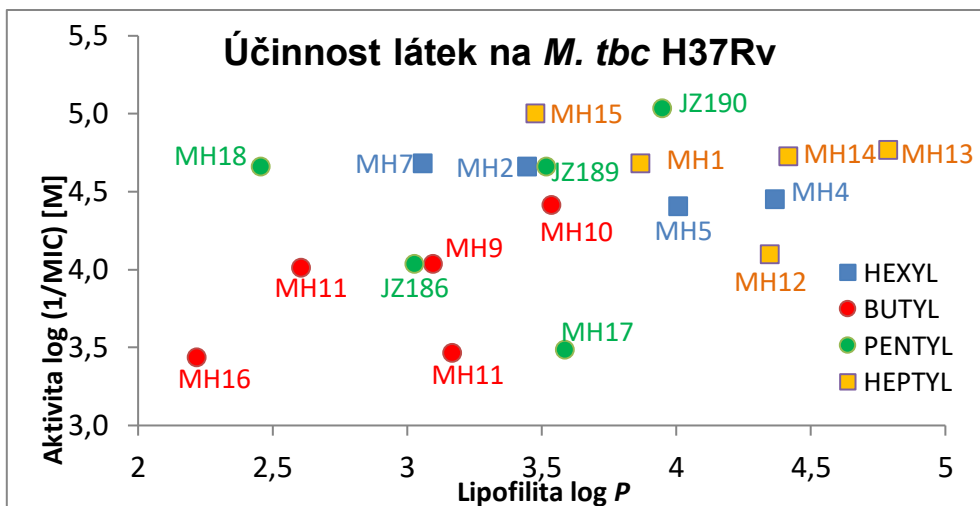
Tabulka č. 2: Antimykobakteriální aktivita nových látek vyjádřená MIC ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v porovnání se standardy. Látky seřazeny dle délky alkylového řetězce (Ak) na pyrazinovém jádře.

	Ak	R	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i> My 80/72	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. smegmatis</i> CCM 4622
MH8	butyl	H	25	>100	>100	≥ 500
MH9	butyl	4-CH ₃	25	>100	>100	≥ 250
MH10	butyl	3-CF ₃	12,5	>100	>100	250
MH11	butyl	2-Cl	100	>100	>100	≥ 500
MH16	butyl	4-OH	100	100	50	≥ 500
JZ186	pentyl	H	25	>100	25	≥ 500
JZ189	pentyl	4-CH ₃	6,25	>100	>100	≥ 500
JZ190	pentyl	3-CF ₃	3,13	>100	12,5	≥ 500
MH17	pentyl	2-Cl	>100	>100	>100	≥ 500
MH18	pentyl	4-OH	6,25	>100	50	≥ 125
MH2	hexyl	H	6,25	>50	>50	≥ 250
MH4	hexyl	3-CF ₃	12,5	>100	25	3,91
MH5	hexyl	2-Cl	12,5	>50	>50	≥ 250
MH7	hexyl	4-OH	6,25	>100	>100	≥ 500
MH1	heptyl	H	6,25	>100	100	≥ 500
MH12*	heptyl	4-CH ₃	25	>100	>100	≥ 125
MH13	heptyl	3-CF ₃	6,25	>100	12,5	62,5
MH14*	heptyl	2-Cl	6,25	>50	>50	≥ 250
MH15	heptyl	4-OH	3,13	>100	>100	≥ 500
INH	–	–	0,39	12,5	6,25	15,625
RFM	–	–	n.t.	n.t.	n.t.	0,39
CPX	–	–	n.t.	n.t.	n.t.	0,098
PZA (pH 5,5)	–	–	6,25-25 [52]	neúčinný[53]	500[54]	250
PZA (pH 6-7)	–	–	125[52]	neúčinný[53]	>500	n.t.

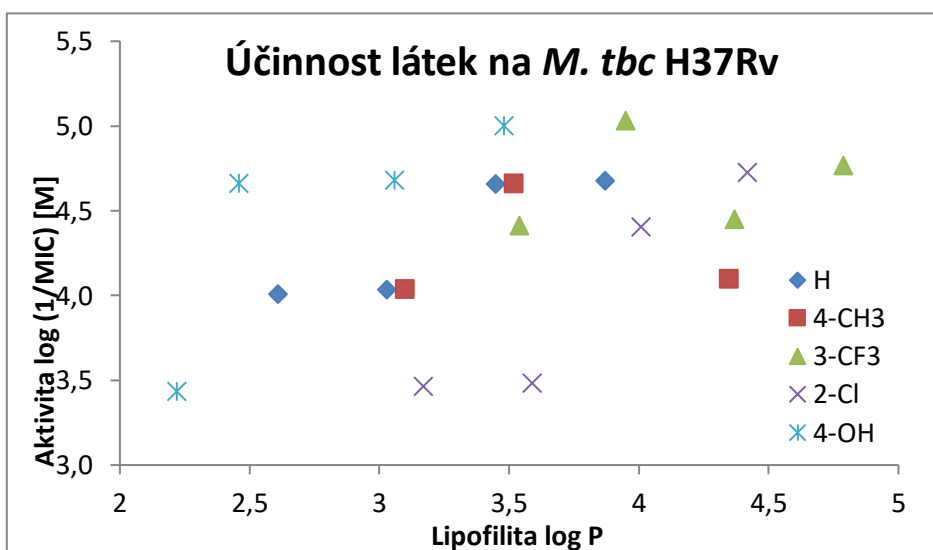
INH – isoniazid; RFM – rifampicin; CPX – ciprofloxacin; PZA – pyrazinamid; n.t. – netestováno (not tested)

*nedostatečná čistota

Dle následujících grafů (graf č.1, 2) můžeme vidět, že závislost aktivity na lipofilitě ($\log P$) nejlépe vychází u látek JZ190 ($3,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $9,3 \mu\text{M}$) a MH15 ($3,13 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, $10 \mu\text{M}$).



Graf 1: Účinnost daných látek na *M. tbc* H37Rv v závislosti na lipofilitě (log *P*) (rozdělení dle délky alkylového řetězce)



Graf č. 2: Účinnost daných látek na *M. tbc* H37Rv v závislosti na lipofilitě log *P* (rozdělení dle substituentů na benzenovém jádře)

4.5.2 Hodnocení *in vitro* cytotoxicity

Látky MH2, JZ189, JZ190, MH13, MH5 a MH15 byly testovány na *in vitro* cytotoxicitu k odlišení specifického účinku od nespecifické cytotoxické aktivity. Testování probíhalo na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové na Katedře farmakologie a toxikologie léčiv.

Cytotoxicita testovaných sloučenin byla měřena na hepatické buněčné linii HepG2 (lidský hepatocelulární karcinom).

Buněčná linie HepG2 hepatocelulárního karcinomu lidských jater (pasáž 12–13), zakoupená od Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, Salisbury, UK) byla rutinně kultivována v Minimum Essential Eagle Medium MEM (Sigma-Aldrich) doplněném 10% fetálním hovězím sérem (PAA), 2mM roztok L-glutaminu (Sigma-Aldrich) a 1% neesenciálním aminokyselinovým roztokem (Sigma-Aldrich) ve zvlhčené atmosféře obsahující 5% CO₂ při 37 ° C.

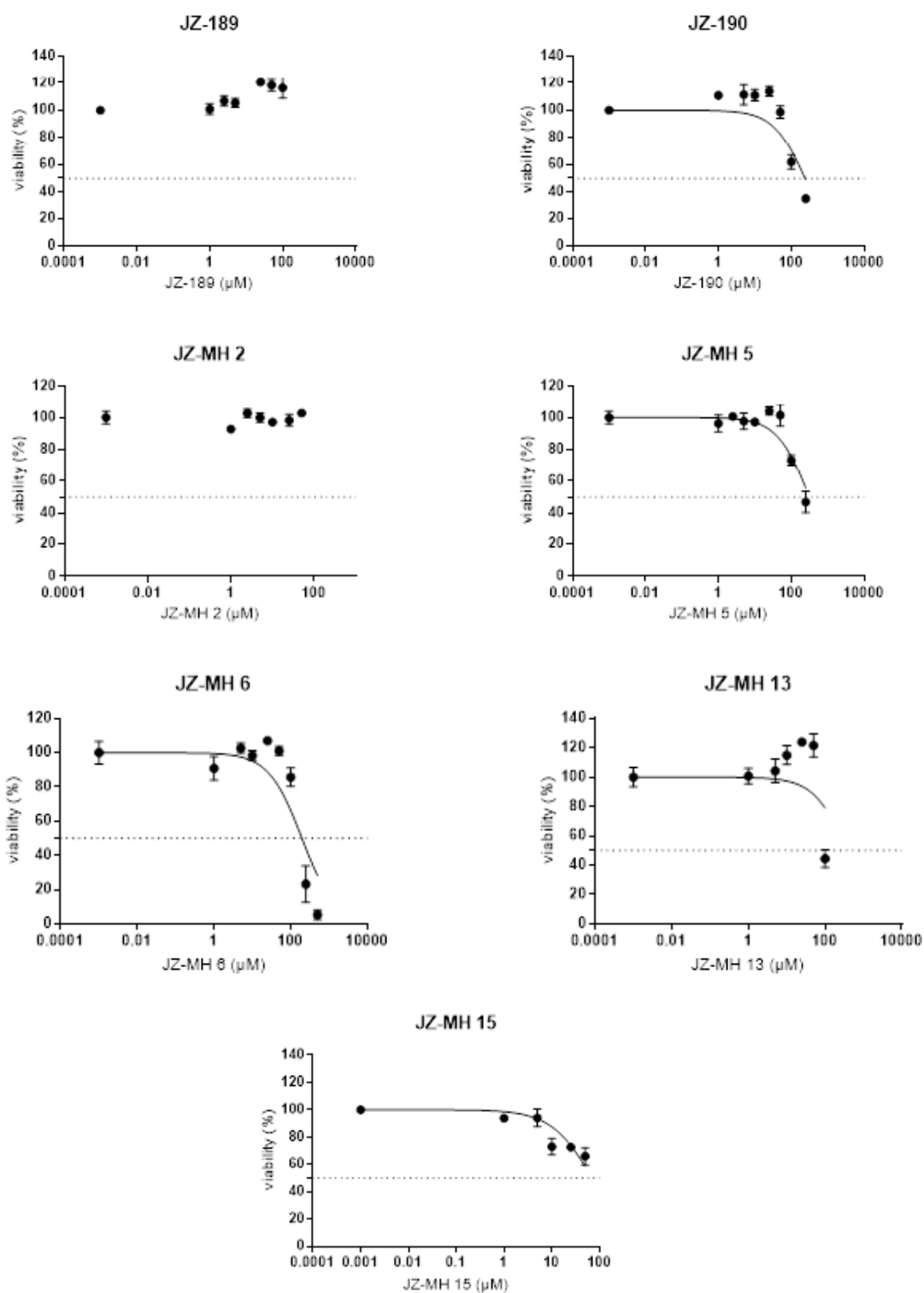
Buňky o hustotě 1×10^4 byly nasazeny do 96-jamkové destičky. Následující den se k buňkám přidaly testované látky rozpuštěné v DMSO. V závislosti na rozpustnosti v DMSO byla koncentrace testovaných sloučenin v rozmezí 1–750 μ M. Jako negativní kontrola sloužila buněčná linie neošetřena testovanými látkami. Inkubace se odehrávala ve vlhké atmosféře s 5 % CO₂ při 37 °C ve třech opakováních. Po uplynutí jednoho dne bylo přidáno činidlo CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Za dvě hodiny byla změřena absorbance při 490 nm. Výsledky cytotoxicity byly vyjádřeny inhibiční koncentrací IC₅₀, která inhibuje 50 % buněk v porovnání s kontrolou (tabulka č. 3). Tato hodnota byla získána regresní analýzou inhibičních křivek (závislosti viability buněk na koncentraci testované látky). Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism verze 7. Inhibiční křivky pro jednotlivé látky jsou znázorněny na obrázku č. 1.

Tabulka č. 3: Výsledky testování *in vitro* cytotoxicity (HepG2)

Testované látky	IC ₅₀ (μM)	Rozsah koncentrací (μM)
JZ189	>100*	1–750
JZ190	238,3	1–750
MH2	>50*	1–750
MH5	>250* (313,6)	1–750
MH13	>100*	1–750
MH15	>50*	1–750

*Měření při vyšší koncentraci nebylo možné z důvodu srážení testované sloučeniny v buněčném kultivačním médiu

Omezená rozpustnost sloučenin JZ189, MH2, MH5, MH13 a MH15 v médiu buněčné kultury neumožnila platný výpočet hodnoty IC₅₀.



Obrázek č. 1 Inhibiční křivky testovaných sloučenin na linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2)

4.5.3 Antibakteriální aktivita

Účinnost na bakterie (tabulka č. 4) byla zkoušena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Testované bakterie byly suspendovány v 0,85 % roztoku NaCl. Po úpravě vznikla suspenze hustoty ekvivalentní 0,5 Mc Farlandovy stupnice ($1,5 \times 10^8$ CFU.ml⁻¹). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a naředěny půdou (látky byly obtížně rozpustné). Testovalo se mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách (200 µl media + 10 µl suspenze inokula). Jako médium byl použit Mueller–Hintonův bujon č. 2 (CAMHB) o pH 7,0. Inokulace probíhala 24–48 hodin při 35 °C, staticky, bez přístupu světla, v humidní atmosféře. Vyhodnocení probíhalo vizuálně.

Ani jedna z testovaných látek ve stanovených koncentracích nevykazovala na testované kmeny bakterií aktivitu. Maximální koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 µmol.l⁻¹ (pro MH1, MH2, MH4, MH8, MH9, MH10, MH11, MH13, MH15, MH16, JZ186, JZ189, JZ190) a 250 µmol.l⁻¹ (pro MH5, MH14).

Tabulka č. 4: Testované kmeny bakterií

Testované kmeny (kód, číslo)	
1. SA <i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>	ATCC 29213, CCM 4223, lab.ID 142-2016
2. MRSA <i>Staphylococcus aureus</i> spp. <i>aureus</i>	ATCC 43300, CCM 4750, lab.ID 143-2016
3. SE <i>Staphylococcus epidermidis</i>	klinický izolát, lab.ID 112-2016
4. EF <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212, CCM 4224, lab.ID 164-2016
5. EC <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922, CCM 3954, lab.ID 162-2016
6. KP <i>Klebsiella pneumoniae</i>	klinický izolát, lab.ID 64-2016
7. SEMA <i>Serratia marcescens</i>	klinický izolát, lab.ID 62-2016
8. PA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853, CCM 3955, lab.ID 163-2016

4.5.4 Antifungální aktivita

Stanovování aktivity sloučenin vůči kmenům hub a plísní bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Kmeny hub jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Testované látky se špatně rozpouštěly v DMSO, dále pak byly naředěny půdou. Testování probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách (200 μ l media + 10 μ l suspenze inokula), při 35 °C, pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165M), v médiu RPMI 1640 s glutaminem a 2 % glukosy. Inkubace probíhala staticky, bez přístupu světla, v humidní atmosféře po dobu 24–48 hodin. Hustota výsledné inokulační suspenze měla hodnotu 0,5–2 x 10³ CFU.ml⁻¹. K porovnání byl použit standard antimykotikum nystatin. Po vizuálním odečítání se výsledky vyjádřily jako MIC (μ mol.l⁻¹).

Ani jedna z testovaných sloučenin ve stanovených koncentracích nevykazovala antifungální aktivitu. Maximální koncentrace zkoušených látek v jamkách mikrotitrační destičky byly 500 μ mol.l⁻¹ (pro MH1, MH2, MH4, MH10, MH11, MH13, MH17, JZ186, JZ189, JZ190), 250 μ mol.l⁻¹ (pro MH5, MH14) a 125 μ mol.l⁻¹ (pro MH8, MH9, MH15, MH16, JZ189).

Tabulka č. 5: Testované kmeny hub

Testované kmeny (kód, číslo)	
1. CA1 - <i>Candida albicans</i>	ATCC 24433, CCM 8320, lab.ID 166-2016
2. CK - <i>Candida krusei</i>	ATCC 6258, CCM 8271, lab.ID 169-2016
3. CP - <i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019, CCM 8260, lab.ID 167-2016
4. CT - <i>Candida tropicalis</i>	ATCC 750, CCM 8264, lab.ID 170-2016
5. AF - <i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 204305, lab.ID 169-2017
6. AF1a - <i>Aspergillus flavus</i>	CCM 8363, lab.ID 174-2017
7. AC - <i>Absidia corymbifera</i>	CCM 8077, lab.ID 173-2017
8. TI – <i>Trichophyton interdigitale</i>	ATCC 9533, CCM 8377, lab.ID 172-2017

5 DISKUZE

Nově nasyntetizované látky jsme získali z pyrazin-2-karbonitrilu, který byl podroben homolytické radikální alkylaci, alkalické hydrolyze a amidaci za vzniku konečných produktů derivátů 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů. Příprava derivátů 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů trvala přibližně pět hodin za mírných podmínek.

Výtěžky (chromatograficky čistého produktu po všech čistících operacích) se pohybovaly v rozmezí od 5 % do 70 % teoretického výtěžku s průměrnou hodnotou 32,5 %. Ztráty byly zřejmě zapříčiněny čistícími operacemi (chromatografické čištění, adsorpce na silikagel).

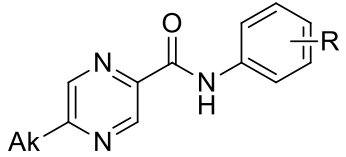
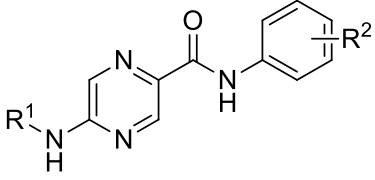
Při reakci 5-alkylpyrazin-2-karboxylové kyseliny s CDI docházelo k šumění a tvorbě bublinek v důsledku uvolňujícího se CO₂ po rozpadu karboxylové kyseliny.

Pomocí stanovení ¹H a ¹³C NMR, IČ spekter a elementární analýzy byly prověřeny předpokládané struktury. Další kontrolu poskytla změřená teplota tání. Všechny připravené látky byly pevného skupenství a měly bílou popřípadě lehce nažloutlou barvu.

Dalšími důležitými hodnotami, které charakterizují lipofilitu látek, jsou log *P* a Clog *P*, které byly vypočítány pomocí programu ChemDraw. Hodnoty log *P* se pohybovaly v rozmezí od 2,22 do 4,79.

Na základě dříve potvrzené aktivity derivátů 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů s delším alkylovým řetězcem na pyrazinovém jádře jsme chtěli ověřit, zda je opravdu aktivita sloučenin s hexylovým či heptylovým řetězcem vyšší než u sloučenin s kratším alkylovým řetězcem [55]. Srovnání antimykobakteriální aktivity (*M. tbc* H37Rv) mezi 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy a 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidy je v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Porovnání antimykobakteriální aktivity (MIC *M. tbc* H37Rv) mezi 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů a 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů.

5-alkyl- <i>N</i> -fenylpyrazin-2-karboxamidů				5-alkylamino- <i>N</i> -fenylpyrazin-2-karboxamidů			
							
kód	Ak	R	MIC (μg.ml ⁻¹)	MIC (μg.ml ⁻¹)	R ¹	R ²	kód
MH8	butyl	H	25	1,56*	butyl	H	1b
JZ186	pentyl	H	25	3,13*	pentyl	H	1c
MH2	hexyl	H	6,25	0,78*	hexyl	H	1d
MH1	heptyl	H	6,25	0,78*	heptyl	H	1e
PZA	-	-	6,25*				
pH 5,5	-	-	6,25*				
INH	-	-	0,2–0,39*				

* reference [55]

Opět můžeme konstatovat, že delší postranní řetězec (C₆, C₇) pozitivně ovlivňuje účinnost sloučenin na mykobakterie (*M. tbc* H37Rv), tzn. čím je alkylový řetězec na pyrazinovém jádře delší, tím má sloučenina vyšší lipofilitu, která by mohla pozitivně ovlivnit přechod látek přes lipofilní mykobakteriální buněčnou stěnu.

Dále jsme chtěli zhodnotit, jak bude ovlivněna aktivita u sloučenin s různě substituovaným benzenovým jádrem (-Cl, -CH₃, -OH, -CF₃) (tabulka č. 7). Při porovnávání jednotlivých hodnot MIC (μg.ml⁻¹) můžeme vidět, že u derivátů substituovaných CF₃ skupinou je aktivita na kmeny mykobakterií vyšší než u derivátů s ostatními substituenty.

Tabulka č. 7: Antimykobakteriální aktivita nových látek, rozdělení dle funkční skupiny

	Ak	R	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i> My 80/72	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. smegmatis</i> CCM 4622
MH11	butyl	2-Cl	100	>100	>100	≥500
MH17	pentyl	2-Cl	>100	>100	>100	≥500
MH5	hexyl	2-Cl	12,5	>50	>50	≥250
MH14*	heptyl	2-Cl	6,25	>50	>50	≥250
MH10	butyl	3-CF ₃	12,5	>100	>100	250
JZ190	pentyl	3-CF ₃	3,13	>100	12,5	≥500
MH4	hexyl	3-CF ₃	12,5	>100	25	3,91
MH13	heptyl	3-CF ₃	6,25	>100	12,5	62,5
MH9	butyl	4-CH ₃	25	>100	>100	≥250
JZ189	pentyl	4-CH ₃	6,25	>100	>100	≥500
MH12*	heptyl	4-CH ₃	25	>100	>100	≥125
MH16	butyl	4-OH	100	100	50	≥500
MH18	pentyl	4-OH	6,25	>100	50	≥125
MH7	hexyl	4-OH	6,25	>100	>100	≥500
MH15	heptyl	4-OH	3,13	>100	>100	≥500
MH8	butyl	H	25	>100	>100	≥500
JZ186	pentyl	H	25	>100	25	≥500
MH2	hexyl	H	6,25	>50	>50	≥250
MH1	heptyl	H	6,25	>100	100	≥500

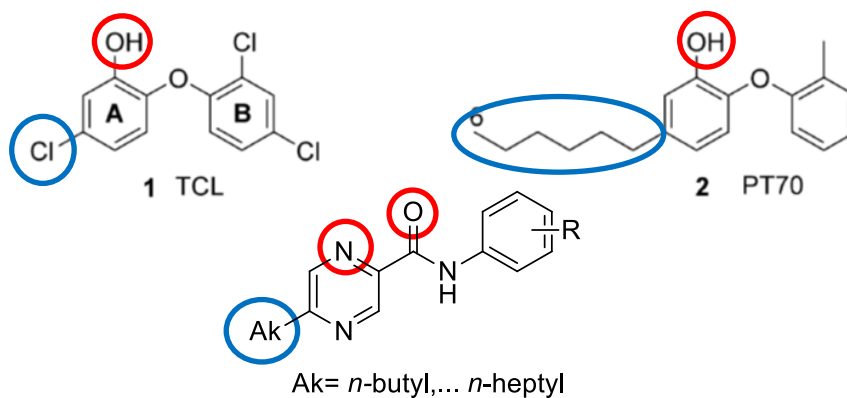
* látky s nedostatečnou čistotou dle elementární analýzy

Látky s delším postranním řetězcem a substituované trifluormethylovou skupinou v poloze tři benzenového jádra (JZ190, MH4, MH13) měly nejširší spektrum účinku. Při testování na *M. tuberculosis* H37Rv byla u devíti látek (MH1, MH2, JZ189, JZ190, MH7, MH13, MH14, MH15 a MH18) zaznamenána MIC v rozmezí hodnot MIC = 3,13–6,25 µg.ml⁻¹ (9,3–22,1 µM). Některé z nich (MH2, JZ189, JZ190, MH13, MH5 a MH15) byly otestovány na *in vitro* cytotoxicitu (HepG2). Dle vypočítaných hodnot SI (index selektivity) je nejlepším kandidátem na bezpečné léčivo látka JZ190 (SI = 25,6) (Tabulka č.8). Dle průběhu inhibičních křivek (obrázek č. 1) lze předpokládat SI > 10 i pro sloučeniny JZ189 a MH2, i když jejich IC₅₀ nemohla být přesně určena.

Tabulka č. 8: Index selektivity (SI) (IC_{50} / MIC [μ M])

Látky	Ak	R	<i>M. tbc</i> H37Rv MIC (μ M)	HepG2 IC ₅₀ (μ M)	SI
JZ189	pentyl	4-CH ₃	22,1	>100*	>4,5
JZ190	pentyl	3-CF ₃	9,3	238,3	25,6
MH2	hexyl	H	22,1	>50*	>2,3
MH5	hexyl	2-Cl	39,3	>250* (313,6)	>6,4 (8,0)
MH13	heptyl	3-CF ₃	17,1	>100*	>5,6
MH15	heptyl	4-OH	10,0	>50*	>5,0

Důležitou roli může hrát i struktura látek, která je výrazně podobná se strukturami inhibitorů enoyl-ACP reduktasy (triclosan, PT70). Pro vazbu na enoyl-ACP reduktasu je důležitá přítomnost dvou (hetero)aromatických jader, lipofilního substituentu v odpovídající poloze jádra A (vyznačeno modře) a akceptoru vodíkového můstku (označeno červeně) (Obrázek č. 2) [56]. Možný motiv k budoucímu testování *in silico* (molekulární docking) a případně *in vitro* na izolovaném enzymu.



Obrázek č. 2: Porovnání struktur triklosanu, PT70 a derivátů 5-alkyl-*N*-fenylypyrazin-2-karboxamidů.

6 ZÁVĚR

V teoretické části jsem zpracovala rešerši o tuberkulóze, zabývala se charakteristikou a poznatky získanými ze světa i z území ČR. Nedílnou součástí tvořila problematika pojednávající o možnostech léčby a výskytu rezistence.

V experimentální části jsem popsala postup přípravy všech 19 nových, v literatuře dosud nepopsaných derivátů 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů (dle CAS SciFinder ke dni 27.4.2017). Struktura získaných sloučenin byla potvrzena pomocí ^1H a ^{13}C NMR, IČ spekter, teploty tání a elementární analýzy. V programu ChemDraw byly zpracovány chemické vzorce, vypočteny hodnoty $\log P$, $\text{Clog } P$ a hodnoty teoretické elementární analýzy.

Látky MH12 a MH14 dle výsledků elementární analýzy nebyly dostatečně čisté, proto budou přečištěny a opětovně testovány na biologickou aktivitu.

U každé nově nasyntetizované látky byla testována účinnost na mykobakterie, houby a bakterie. Antifungální a antibakteriální aktivita u testovaných látek v testovaných koncentracích nebyla prokázána. Nejvyšší účinek proti *M. tbc* H37Rv měly sloučeniny JZ190 ($3,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $9,3 \mu\text{M}$), MH13 ($6,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $17,1 \mu\text{M}$) a MH15 ($3,13 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $10,0 \mu\text{M}$). Při testování *in vitro* cytotoxicity (HepG2) měla hodnotu $\text{SI} > 10$ prokazatelně (tj. podařilo se získat konkrétní hodnotu IC_{50}) pouze látka JZ190 ($\text{SI} = 25,62$), tzn. mohla by patřit k bezpečným léčivům.

Látka MH13 ($12,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $34,2 \mu\text{M}$) byla aktivní na *M. kansasii*. MH4 působila i na *M. smegmatis* ($3,91 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $11,1 \mu\text{M}$).

Vyhodnocením všech výsledků jsme došli k závěru, že antimykobakteriální aktivitu pozitivně ovlivňuje substituce benzenového jádra trifluormethylovou skupinou v poloze tři. Pro odlišení specifického účinku od nespecifické cytotoxicity byly vybrané sloučeniny (MH2, JZ189, JZ190, MH13, MH5 a MH15) testovány na *in vitro* cytotoxicitu na linii lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2). Omezená rozpustnost v médiu buněčné kultury neumožnila platný výpočet hodnoty IC_{50} pro většinu testovaných látek (JZ189, MH2, MH5,

MH13, MH15). Toto zjištění můžeme ovšem interpretovat i tak, že tyto látky nebyly výrazně cytotoxické v dosažených koncentracích.

Nakonec můžeme potvrdit hypotézu o delším postranním řetězci, tj. čím je alkylový řetězec na pyrazinovém jádře delší, tím má sloučenina vyšší lipofilitu, která by mohla pozitivně ovlivnit přechod látek přes lipofilní mykobakteriální buněčnou stěnu.

7 ABSTRAKT

DERIVÁTY 5-ALKYLPYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY JAKO
POTENCIÁLNÍ ANTIINFEKTIVA

HALÍŘOVÁ MARTINA

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

Již dřívější studie prokázaly, že deriváty 5-alkylamino-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů s delším alkylovým řetězcem (C₅-C₈) v mikromolárních koncentracích inhibovaly růst *M. tuberculosis* H37Rv. Domníváme se, že dlouhý alkylaminový řetězec by mohl usnadnit průchod léčiva přes lipofilní buněčnou stěnu mykobakterie. Pro ověření této hypotézy jsme provedli izosterickou záměnu sekundární aminoskupiny postranního řetězce za methylenovou skupinu a připravili sérii derivátů 5-alkyl-*N*-fenylpyrazin-2-karboxamidů. Kyseliny 5-alkylpyrazin-2-karboxylové (5-Ak-POA) byly získány pomocí homolytické alkylace z pyrazin-2-karbonitrilu a příslušné alkanové kyseliny. Konečné deriváty byly připraveny CDI zprostředkovanou reakcí 5-Ak-POA s příslušným anilinem při laboratorní teplotě.

U nových sloučenin byla stanovena teplota tání, elementární analýza, IČ a ¹H, ¹³C NMR spektra. Poté byly testovány *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis* H37Rv a na několik dalších netuberkulózních kmenů. Několik sloučenin mělo hodnotu MIC v rozmezí 3.13–6.25 μg.ml⁻¹. Nejširší spektrum aktivity vykazovaly sloučeniny, které měly substituované benzenové jádro v poloze 3 CF₃ skupinou. Podrobné vztahy mezi aktivitou a strukturou budou diskutovány.

8 ABSTRACT

DERIVATIVES OF 5-ALKYLPYRAZINE-2-CARBOXYLIC ACID AS POTENTIAL ANTI-INFECTIVES

HALÍŘOVÁ MARTINA

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

In our previous study, we have demonstrated that 5-alkylamino-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides with longer alkyl chain (C₅-C₈) exerted micromolar growth inhibition activity against *M. tuberculosis* H37Rv. We speculated that the long alkylamino chain could facilitate the penetration of lipophilic mycobacterial cell envelope. To test this hypothesis, we performed the amino to methylene isosteric exchange and designed a series of 5-alkyl-*N*-phenylpyrazine-2-carboxamides. 5-Alkylpyrazine-2-carboxylic acids (5-Ak-POA) were prepared by homolytic alkylation of commercially available pyrazine-2-carbonitrile by respective alkanolic acid, followed by hydrolysis of the carbonitrile group. Final derivatives were prepared by CDI mediated coupling of 5-Ak-POA with corresponding aniline at RT.

Final compounds were described by melting point, elementary analysis, IR spectroscopy and ¹H, ¹³C NMR. Then they were tested *in vitro* for antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv and several non-tuberculous mycobacterial strains. Several compounds exerted MIC of 3.13–6.25 µg mL⁻¹. Compounds with R = 3-CF₃ had a broad spectrum of activity covering the non-tuberculous mycobacteria. Detailed structure-activity relationships are discussed.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HOMOLKA, Jiří. *Tuberkulóza*. 5., upravené vydání. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016, str. 14-57, ISBN 9788024634760.
- [2] World Health Organization, Tuberculosis Key facts dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (citace 15.3.2017)
- [3] *Zdravotnická statistika. Tuberkulóza a respirační nemoci 2013*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 1993-, str. 11-24, ISBN 9788074720987.
- [4] POKORNÝ, Antonín, František SALAJKA a Zdeněk MERTA. *Tuberkulóza*. Brno: Masarykova univerzita, 1998, str. 9-42, ISBN 80-210-1851-8.
- [5] Přednáška, Mykobaktéria, Alena Ševčíková, OKM
- [6] Přednáška, Tuberkulóza a její léčba, Přemysl Mladěnka, FAF UK
- [7] *Konference o mikrobiologii a epidemiologii tuberkulózy a nespécifických plicních infekcí: 16.10.-18.10.2002 Hradec Králové : [sborník přednášek]*. Hradec Králové: HK Credit, c2002, str. 5-35, ISBN 8090275370.
- [8] Potrepčiaková, S. & J. Skříčková (2008) Tuberkulóza. *Practicus: Odborný časopis Společnosti všeobecného lékařství ČLS JEP*, 7, 24-29.
- [9] World Health Organization, Global tuberculosis report 2016, http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ [citace 19.3.2017]
- [10] Vakcinace, http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/TBC.htm [citace 19.11.2016]
- [11] Ministerstvo zdravotnictví České Republiky, Vyhláška č. 299 / 2010 Sb. http://www.mzcr.cz/Verejne/obsah/vyhlaska-c299/2010-sb-_2464_5.html, [citace 19.3.2017]
- [12] Black, P. A., R. M. Warren, G. E. Louw, P. D. van Helden, T. C. Victor & B. D. Kana (2014) Energy Metabolism and Drug Efflux in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 2491-2503.
- [13] Kaufmann, S. H. E., J. Weiner & C. F. von Reyn (2017) Novel approaches to tuberculosis vaccine development. *International Journal of Infectious Diseases*, 56, 263-267.

- [14] Liu, J., V. Tran, A. S. Leung, D. C. Alexander & B. Zhu (2009) BCG Vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines*, 5, 70-78.
- [15] Shirvani, F., A. Karimi & M. Rajabnejad (2016) BCG Vaccination as a Prevention Strategy, Threats and Benefits. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 4, 1-10.
- [16] Bártů, V. (2008) Tuberkulóza – infekční choroba v 21. století. *Medicína Pro Praxi*, 5, 245–248.
- [17] Ptáková, M. (2011) Současné laboratorní diagnostické možnosti tuberkulózy a mykobakterióz, *Medicína pro praxi*, 8, 466-468.
- [18] Da Silva, P. E. A. & J. C. Palomino (2011) Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1417-1430.
- [19] SALAJKA, František, Zdeňka PARÁKOVÁ a Eva PRCHALOVÁ, ed. *Aktuality oboru pneumologie, ftizeologie a ošetrovatelství: obstrukce : tuberkulóza : postgraduální kurz: Paliativní a symptomatická péče v pneumoonkologii : blok I. - Bolest*. Hradec Králové: Nadační fond pro léčbu a výzkum plicních a přidružených onemocnění, 2009, str. 33-42, ISBN 978-80-254-4209-8.
- [20] PARÁKOVÁ, Zdeňka, Eva PRCHALOVÁ a František SALAJKA, ed. *Aktuality oboru pneumologie, ftizeologie a ošetrovatelství: obstrukce, tuberkulóza : postgraduální kurz Paliativní a symptomatická péče v pneumologii : blok II. - nutrice*. Hradec Králové: [s.n.], 2010, str. 31-37, ISBN 978-80-254-6939-2.
- [21] Jang, J.-C., Y.-G. Jung, J. Choi, H. Jung & S. Ryoo (2017) Bedaquiline susceptibility test for totally drug-resistant tuberculosis Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Microbiology*, 46, 1-5.
- [22] van den Boogaard, J., G. S. Kibiki, E. R. Kisanga, M. J. Boeree & R. E. Aarnoutse (2009) New Drugs against Tuberculosis: Problems, Progress, and Evaluation of Agents in Clinical Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 849-862.
- [23] Black, P. A., R. M. Warren, G. E. Louw, P. D. van Helden, T. C. Victor & B. D. Kana (2014) Energy Metabolism and Drug Efflux in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 2491-2503.

- [24] Arbex, M. A., M. D. L. Varella, H. R. de Siqueira & F. A. F. de Mello (2010) Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 1: First-line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, 36, 626-640.
- [25] Drug bank - isoniazid, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00951> [citace 10.12.2016]
- [26] Metushi, I., J. Uetrecht & E. Phillips (2016) Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity: then and now. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81, 1030-1036.
- [27] Wang, P. C., K. Pradhan, X. B. Zhong & X. C. Ma (2016) Isoniazid metabolism and hepatotoxicity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6, 384-392.
- [28] PubChem,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3767#section=Toxicity-Summary> [citace 10.12.2016]
- [29] Drugbank - pyrazinamid, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00339> [citace 10.1.2017]
- [30] Drugbank - rifampicin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01045> [citace 10.1.2017]
- [31] Drugbank - ethambutol, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00330> [citace 10.1.2017]
- [32] Jóźwiak, Krzysztof. W. J. Lough, and Irving W. Wainer. *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*. London: Informa Healthcare, 2012, str. 222-223, ISBN 1420092383.
- [33] Field, S. K., D. Fisher, J. M. Jarand & R. L. Cowie (2012) New treatment options for multidrug-resistant tuberculosis. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 6, 255-268.
- [34] Di Perri, G. & S. Bonora (2004) Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 593-602.
- [35] Coyne, K. M., A. L. Pozniak, M. Lamorde & M. Boffito (2009) Pharmacology of second-line antituberculosis drugs and potential for interactions with antiretroviral agents. *Aids*, 23, 437-446.

- [36] Minato, Y., J. M. Thiede, S. L. Kordus, E. J. McKlveen, B. J. Turman & A. D. Baughn (2015) Mycobacterium tuberculosis Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for para-Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 5097-5106.
- [37] Arbex, M. A., M. D. L. Varella, H. R. de Siqueira & F. A. F. de Mello (2010) Antituberculosis drugs: Drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: Second line drugs. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, 36, 641-656.
- [38] Alahari A, Trivelli X, Guérardel Y, Dover LG, Besra GS, Sacchettini JC, et al. (2007) Thiacetazone, an Antitubercular Drug that Inhibits Cyclopropanation of Cell Wall Mycolic Acids in Mycobacteria. *PLoS ONE*, 2, 1-12.
- [39] Caminero, J. A., G. Sotgiu, A. Zumla & G. B. Migliori (2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 621-629.
- [40] Gualano, G., S. Capone, A. Matteelli & F. Palmieri (2016) New antituberculosis drugs: from clinical trial to programmatic use. *Infectious Disease Reports*, 8, 43-49.
- [41] Parida, S. K., R. Axelsson-Robertson, M. V. Rao, N. Singh, I. Master, A. Lutckii, S. Keshavjee, J. Andersson, A. Zumla & M. Maeurer (2015) Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *Journal of Internal Medicine*, 277, 388-405.
- [42] van den Boogaard, J., G. S. Kibiki, E. R. Kisanga, M. J. Boeree & R. E. Aarnoutse (2009) New Drugs against Tuberculosis: Problems, Progress, and Evaluation of Agents in Clinical Development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 849-862.
- [43] Lewis, J. M. & D. J. Sloan (2015) The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11, 779-791.
- [44] Cox, E. & K. Laessig (2014) FDA Approval of Bedaquiline - The Benefit-Risk Balance for Drug-Resistant Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 371, 689-691.

- [45] Diacon, A. H., A. Pym, M. P. Grobusch, J. M. de los Rios, E. Gotuzzo, I. Vasilyeva, V. Leimane, K. Andries, N. Bakare, T. De Marez, M. Haxaire-Theeuwes, N. Lounis, P. Meyvisch, E. De Paepe, R. P. G. van Heeswijk, B. Dannemann & T. C. S. Grp (2014) Multidrug-Resistant Tuberculosis and Culture Conversion with Bedaquiline. *New England Journal of Medicine*, 371, 723-732.
- [46] van Heeswijk, R. P. G., B. Dannemann & R. M. W. Hoetelmans (2014) Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug-drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69, 2310-2318.
- [47] Shore, D. G. M., K. A. Wasik, J. P. Lyssikatos & A. A. Estrada (2015) Minisci alkylations of electron-deficient pyrimidines with alkyl carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 56, 4063-4066.
- [48] Minisci reaction, https://en.wikipedia.org/wiki/Minisci_reaction [citace 10.11.2016]
- [49] Kucerova-Chlupacova, M., V. Opletalova, J. Jampilek, J. Dolezel, J. Dohnal, M. Pour, J. Kunes & V. Vorisek (2008) New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine rings derived from RP-HPLC study. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 73, 1-18.
- [50] Valeur, E. & M. Bradley (2009) Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, 38, 606-631.
- [51] Paul, R. & G. W. Anderson (1960) N,N '-Carbonyldiimidazole, a new peptide forming Reagent. *Journal of the American Chemical Society*, 82, 4596-4600.
- [52] Salfinger, M. & L. B. Heifets (1988) Determination of Pyrazinamide MICS for Mycobacterium-tuberculosis at different PHS by the radiometric method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1002-1004.
- [53] Heifets, L. B., M. D. Iseman, A. J. Crowle & P. J. Lindholmlevy (1986) Pyrazinamide is not active invitro against Mycobacterium-avium complex. *American Review of Respiratory Disease*, 134, 1287-1288.
- [54] Sun, Z. H. & Y. Zhang (1999) Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of Mycobacterium kansasii to the antituberculosis drug pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 537-542.

- [55] Zitko, J., B. Servusova, A. Janoutova, P. Paterova, J. Mandikova, V. Garaj, M. Vejsova, J. Marek & M. Dolezal (2015) Synthesis and antimycobacterial evaluation of 5-alkylamino-N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 174-183.
- [56] Servusova, B., P. Paterova, J. Mandikova, V. Kubicek, R. Kucera, J. Kunes, M. Dolezal & J. Zitko (2014) Alkylamino derivatives of pyrazinamide: Synthesis and antimycobacterial evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 450-453.