

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**

# **Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.**

Diplomová práce

Pavλίna Niklová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

*„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.“*

V Hradci Králové dne 19. 4. 2018

.....

Pavλίna Niklová

Ráda bych velice poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. za vstřícný přístup, ochotu a cenné rady při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala BSc. Ghaďě Bouz za její rady a významnou pomoc při syntéze látek. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Tato diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV 260 401 a také grantu GAUK C-C3/1572317 (2017-2019) - Charles University Grant Agency (GAUK) - Derivatives of pyrazinecarboxylic acid as potential antimycobacterial active drugs (Ghada Bouz).

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Abstrakt.....   | 7  |
| 2.    | Abstract.....   | 8  |
| 3.    | Seznam použitých zkratk ..... 9                               | 9  |
| 4.    | Úvod a cíl práce .....  | 10 |
| 5.    | Teoretická část .....   | 11 |
| 5.1   | Tuberkulóza.....  | 11 |
| 5.1.1 | Základní charakteristika .....                                | 11 |
| 5.1.2 | Epidemiologie .....   | 11 |
| 5.1.3 | Původce onemocnění.....                                       | 12 |
| 5.1.4 | Klinický obraz .....  | 13 |
| 5.1.5 | Diagnostika.....  | 13 |
| 5.1.6 | Prevence onemocnění a vakcinace .....                         | 13 |
| 5.2   | Léčba tuberkulózy .....                                       | 14 |
| 5.2.1 | Antituberkulotika 1. volby .....                              | 16 |
| 5.2.2 | Antituberkulotika 2. linie .....                              | 20 |
| 5.2.3 | Vývoj nových léčiv .....                                      | 20 |
| 6.    | Experimentální část.....                                      | 29 |
| 6.1   | Přístroje a chemikálie .....                                  | 29 |
| 6.2   | Úvod do experimentální části a obecný postup přípravy .....   | 30 |
| 6.3   | Přehled nově připravených sloučenin a jejich vlastností ..... | 31 |
| 6.3.1 | <i>N</i> -propyl- <i>N'</i> -(pyrazin-2-yl)močovina .....     | 31 |
| 6.3.2 | <i>N</i> -butyl- <i>N'</i> -(pyrazin-2-yl)močovina .....      | 32 |
| 6.3.3 | <i>N</i> -pentyl- <i>N'</i> -(pyrazin-2-yl)močovina.....      | 33 |
| 6.3.4 | <i>N</i> -oktyl- <i>N'</i> -(pyrazin-2-yl)močovina .....      | 34 |
| 6.3.5 | <i>N</i> -decyl- <i>N'</i> -(pyrazin-2-yl)močovina.....       | 35 |
| 6.4   | Výsledky biologického hodnocení <i>in vitro</i> .....         | 36 |

|       |                                   |    |
|-------|-----------------------------------|----|
| 6.4.1 | Antimykobakteriální aktivita..... | 36 |
| 6.4.2 | Antibakteriální aktivita.....     | 38 |
| 6.4.3 | Antimykotická aktivita.....       | 39 |
| 7.    | Diskuze .....                     | 41 |
| 8.    | Závěr .....                       | 43 |
| 9.    | Seznam citované literatury.....   | 44 |
| 10.   | Seznam tabulek.....               | 50 |

# 1. Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Řešitel: Pavlína Niklová

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Název diplomové práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.

Tuberkulóza je celosvětovým závažným problémem, a to především z důvodu rychle se rozvíjející rezistence na aktuálně používaná léčiva. V terapii se proto používají zásadně v kombinacích, aby se předešlo možným komplikacím z důvodu selhání léčby. Také se rozvíjí snaha o výzkum nových potenciálně úspěšných léčiv, která budou mít dostatečnou aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis*, nejčastějšímu původci tohoto onemocnění, a zároveň budou dostatečně bezpečná a tedy vhodná pro použití při terapii tuberkulózy.

Na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy je výzkum již dlouhodobě zaměřen na syntézu nových potenciálních antituberkulotik, především derivátů pyrazinu.

V rámci této diplomové práce bylo za využití mikrovlnné syntézy připraveno celkem pět derivátů aminopyrazinu reakcí s isokyanáty s různě dlouhými alkylovými řetězci. Všechny získané látky byly charakterizovány pomocí teplot tání, elementární analýzy, IR spekter a NMR spekter a poté testovány *in vitro* na antimykobakteriální, antibakteriální a antimykotickou aktivitu. Žádná z látek nevykazovala antibakteriální ani antimykotickou aktivitu. Také při testování na antimykobakteriální aktivitu se u většiny látek aktivita neprokázala, kromě *N*-oktyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močoviny, u které byla minimální inhibiční koncentrace proti *M. tuberculosis* a *M. kansasii* 25 µg/ml.

## 2. Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: Pavlína Niklová

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

Title of diploma thesis: Pyrazine Derivatives as Potential Drugs I.

Tuberculosis is serious global problem especially due to its fast resistance development to currently used drugs. Therefore drugs used in therapy are only used in combinations to avoid any possible complications due to treatment failure. In addition, global research is focused on finding new potentially successful drugs with sufficient activity against *Mycobacterium tuberculosis*, main cause of the disease, and acceptable safety, therefore suitable for use in TBC therapy.

Research conducted at the Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis of Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University is focused on the synthesis of potential new antitubercotics, especially pyrazine derivatives.

This study deals with the synthesis of five aminopyrazine derivatives by the reaction of aminopyrazine with different alkyl substituted isocyanates using microwave reactor. All of the synthesized compounds were characterized by their melting point, elemental analysis, IR spectra and NMR spectra and then tested *in vitro* for their antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities. None of the prepared compounds showed any antibacterial or antifungal activity. Also most of them didn't show any antimycobacterial activity with the exception of *N*-octyl-*N'*-(pyrazine-2-yl)urea. Its minimum inhibitory concentration against *M. tuberculosis* and *M. kansasii* was 25 µg/ml.



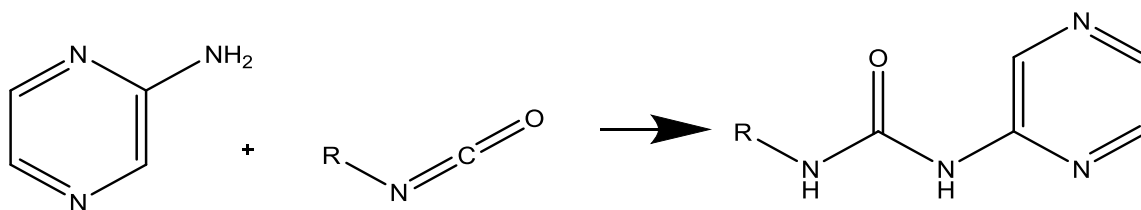
### 3. Seznam použitých zkratek

|           |  |
|-----------|--|
| ATCC      | American Type Collection Cultures                            |
| ATR       | technika zeslabeného úplného odrazu, metoda IR spektrometrie |
| CCM       | Česká sbírka mikroorganismů                                  |
| CNCTC     | Česká národní sbírka typových kultur                         |
| CNS       | centrální nervový systém                                     |
| DMSO      | dimethylsulfoxid   |
| EMA       | Evropská léková agentura                                     |
| FaF UK    | Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova   |
| FDA       | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv                           |
| HIV       | virus lidské imunitní nedostatečnosti                        |
| IR        | infračervené záření  |
| ISBT      | Informační systém bacilární tuberkulózy                      |
| $\log P$  | rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda             |
| <i>M.</i> | <i>Mycobacterium</i>   |
| MIC       | minimální inhibiční koncentrace                              |
| NMR       | nukleární magnetická rezonance                               |
| RTBC      | Registr tuberkulózy  |
| TBC       | tuberkulóza  |
| TLC       | tenkovrstvá chromatografie                                   |
| ÚZIS      | Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR               |
| WHO       | Světová zdravotnická organizace                              |

## 4. Úvod a cíl práce

Svou diplomovou práci jsem vypracovávala na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Výzkum na této katedře je zaměřen mimo jiné na pyrazin a jeho substituce za účelem získání nových látek především s biologickou aktivitou proti *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*. K obměnám dochází buď přímo na pyrazinovém jádru nebo na vedlejším řetězci. [1–5]

Cílem mé diplomové práce je nejprve provést rešerši týkající se problematiky tuberkulózy, její epidemiologie a současných možností léčby. Dále se zaměřím na aktuální situaci ve výzkumu a klinickém testování potenciálních antituberkulotik. V rámci experimentální části mé diplomové práce je cílem nasyntetizovat několik derivátů aminopyrazinu reakcí s isokyanáty a otestovat jejich biologickou aktivitu.



*obecné schéma přípravy nových látek*

## 5. Teoretická část

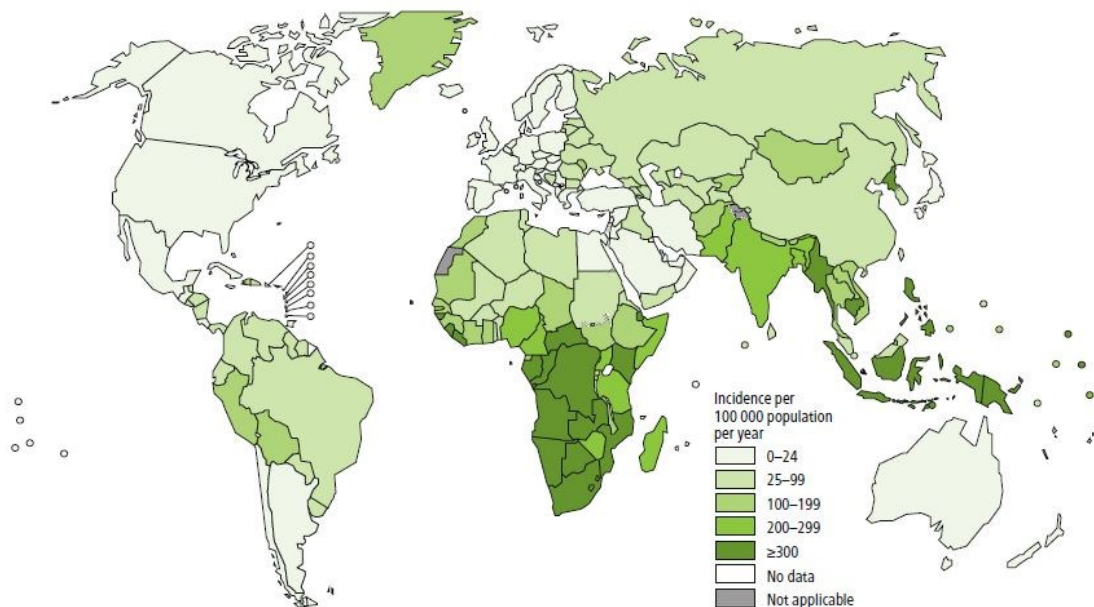
### 5.1 Tuberkulóza

#### 5.1.1 Základní charakteristika

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění přenášené kapénkovou infekcí, které postihuje především plíce, nicméně postiženy mohou být i další orgány. Typickým projevem jsou uzlíky (tzv. tuberkulomy), odtud také pochází název onemocnění, který se používá od roku 1834. Hlavním původcem je *Mycobacterium tuberculosis*, dále se může jednat o *M. bovis* nebo *M. africanum*. [6]

#### 5.1.2 Epidemiologie

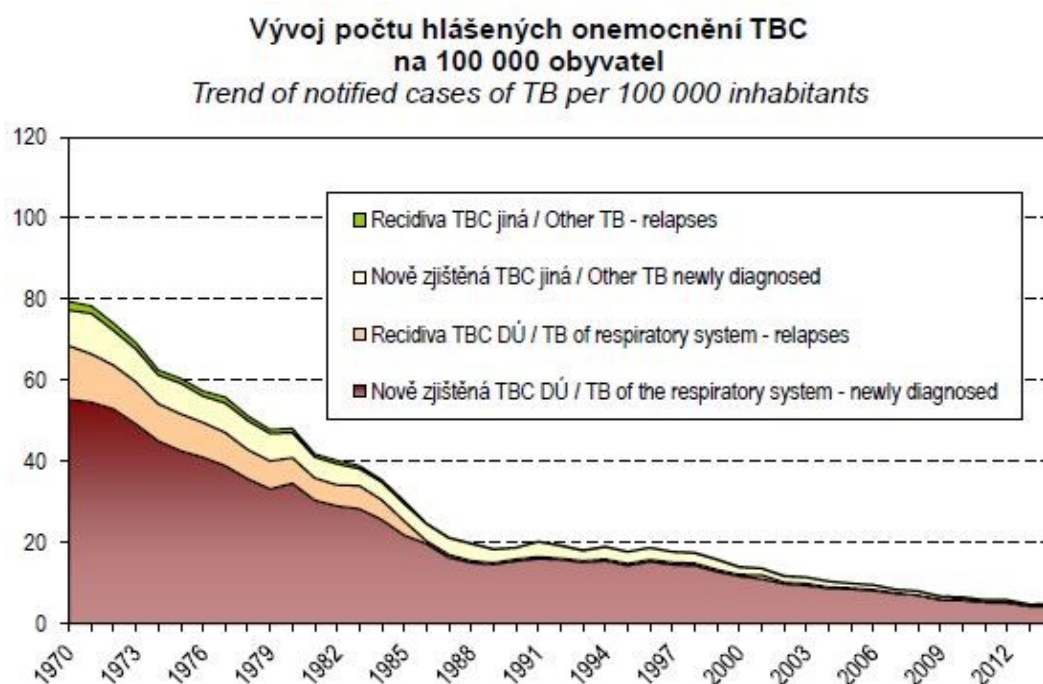
TBC je dle WHO devátou nejčastější příčinou úmrtí na světě. V roce 2016 se tímto onemocněním celosvětově nakazilo 10,4 milionu lidí a zemřelo zhruba 1,6 milionu lidí (z toho 1,3 milionu obětí bylo HIV-negativních a 374 000 HIV-pozitivních). I když ve vyspělých zemích je výskyt tuberkulózy poměrně vzácný, jsou oblasti, kde je TBC neustále aktuálním problémem. Mezi oblastmi s nejvyšší incidencí TBC v roce 2016 patřily jihovýchodní Asie a Afrika (viz Obr. 1). [7]



**Obr. 1:** Odhadovaný výskyt TBC za rok 2016. Převzato z *Global tuberculosis report, WHO, 2017*. [7]

Česká republika patří k zemím s nízkým výskytem tuberkulózy. Dle ÚZIS u nás také její incidence dlouhodobě klesá (viz Obr. 2). [8]

V České republice je povinnost hlásit výskyt onemocnění do Registru tuberkulózy (RTBC). Součástí RTBC je také databáze Informačního systému bacilární tuberkulózy (ISBT), která slouží laboratořím k hlášení pozitivních výsledků mykobakteriologických vyšetření. V roce 2016 bylo do RTBC nahlášeno celkem 517 případů onemocnění tuberkulózou bez rozlišení její formy. Ve většině případů (86,7 %) se jednalo o formu plicní, u ostatních pak mimoplicní. Nejvyšší počet nemocných, celkem 105, byl evidován v Praze, nejnižší pak v Jihočeském kraji. Mezi nakaženými bylo více mužů než žen, téměř 70 % případů. [8, 9]



**Obr. 2:** Vývoj počtu hlášených onemocnění TBC na 100 000 obyvatel. Převzato z *Tuberkulóza a respirační nemoci*, ÚZIS, 2014. [10]

### 5.1.3 Původce onemocnění

Hlavním původcem onemocnění je *Mycobacterium tuberculosis*, ale v menším počtu případů může být TBC způsobeno infekcí *Mycobacterium bovis*, popř. *Mycobacterium africanum*. [11] Jedná se o aerobní tyčinky s velmi lipofilní membránou, jejíž hlavní složkou je mykolová kyselina. [12] Tato silná lipofilita je příčinou acidorezistence, alkalirezistence a alkoholrezistence a také vysoké odolnosti *M. tuberculosis* vůči nepřízni okolního prostředí. [13] Toto je nutno vzít v úvahu při výzkumu nových látek jako možných antituberkulotik.

#### **5.1.4 Klinický obraz**

Rozlišují se dva základní typy tuberkulózy - primární a postprimární. Primární TBC nastává po prvním kontaktu člověka s původcem onemocnění, nejčastěji k tomuto dochází v dětském věku. Po nakažení dochází ke zvětšení lymfatických uzlin a vzniku zánětlivého plicního ložiska, což se označuje jako tzv. Ghonův fokus. Primární tuberkulóza je většinou asymptomatická, pacient se pouze cítí unaveně, může mít zvýšenou teplotu a projevy nechutenství. [13]

Jako postprimární TBC se označuje sekundární infekce u osob, které se s onemocněním již dříve setkaly. Původem onemocnění je tentokrát buď opětovná exogenní nákaza nebo reaktivace primární TBC. U postprimární TBC jsou typicky postiženy plíce. Mezi symptomy může patřit únava, nechutenství a subfebrilie. Typický je kašel, zpočátku suchý, později s produkcí mukopurulentního sputa, v závažnějších případech může nastat až hemoptýza. [13]

#### **5.1.5 Diagnostika**

Základní diagnostickou metodou u TBC je rentgenové vyšetření plic. Typickým nálezem jsou tuberkulózní ložiska, dále může být přítomna fibróza nebo zvětšené nitrohrudní uzliny. Samotný rentgen nicméně nedokazuje jednoznačnou přítomnost TBC, protože podobný nález může být i u dalších onemocnění (např. histoplazmóza, kryptokokóza, kokcidiomykóza a další). Je proto potřeba doplnit jej dalším vyšetřením, například kultivací. Základním materiálem pro kultivaci je sputum, jako vzorek lze také použít výplach z bronchu nebo tekutinu získanou bronchoalveolární laváží. Dále je možno využít mikroskopické vyšetření, kdy se použije speciální metoda barvení na acidorezistentní tyčky, tzv. metoda Ziehl-Neelsen, nebo fluorescenční barvení. [13, 14]

#### **5.1.6 Prevence onemocnění a vakcinace**

TBC je nejčastěji přenášeno inhalací, méně častý způsob přenosu je přímý kontakt s nemocným pacientem nebo pozření infikovaných potravin. Jako základní prevence onemocnění je tedy doporučováno dodržování hygienických zásad. [11] Další možností prevence je vakcinace proti TBC. K očkování se používá tzv. BCG-vakcína (bacille Calmette-Guérin), která obsahuje oslabenou bakterii *M. bovis*. Účinnost této vakcíny je však zhruba 80 %, proto proti onemocnění plně neochrání. [15]

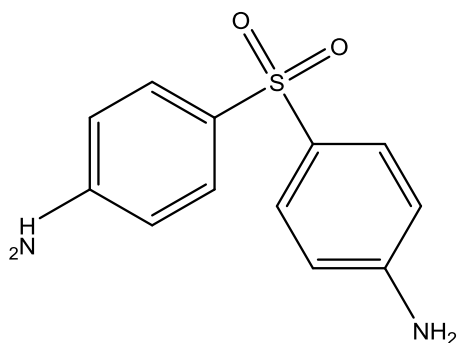
V České republice bylo očkování povinné do 1. listopadu 2010, kdy byla novelizována vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem.

Od tohoto data se v ČR očkují pouze děti, které spadají do rizikových skupin uvedených v příloze této vyhlášky. [16, 17]

## 5.2 Léčba tuberkulózy

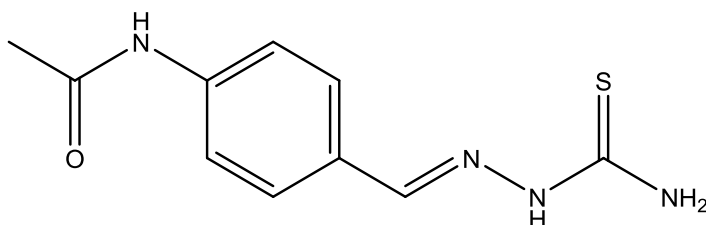
Původce TBC *M. tuberculosis* byl objeven v roce 1882 německým lékařem Robertem Kochem a brzy poté následoval rozvoj výzkumu látek, které by byly účinné v boji proti této mykobakterii. Mezi první zkoušené látky patřila chemická barviva a antiseptika, následovaly silice a těžké kovy, všechny ale bez výraznějšího antituberkulotického účinku. [18]

První synteticky připravenou skupinou látek s antituberkulotickým účinkem byly sulfony. Nejvýznamnějším zástupcem je dapson (4,4'-diaminodifenylsulfon), který se dodnes používá v léčbě lepry, i když má aktivitu také proti *M. tuberculosis*. [18]



*dapson*

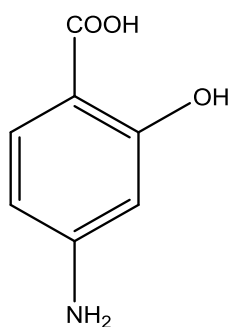
Mezi další významné objevy patří zjištění aktivity u původně meziproductů přípravy dapsonu – thiosemikarbazonů (např. thioacetazon) a hydrazidu isonikotinové kyseliny isoniazidu, který se dodnes používá jako jedno ze základních léčiv v terapii TBC. [18]



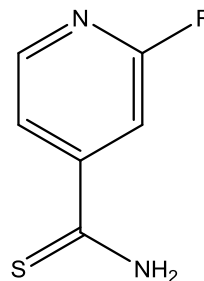
*thioacetazon*

Jako další se vyvíjely látky mířené specificky na metabolismus mykobakterií. Příkladem může být *p*-aminosalicylová kyselina, která blokuje dihydrofolátreduktasu a tím ovlivňuje metabolické pochody u mykobakterií. Ta se ale v současnosti nepoužívá často, bývá spíše lékem druhé volby při rezistenci na antituberkulotika první volby.

Dalšími objevenými látkami byly dodnes používány pyrazinový analog nikotinamidu pyrazinamid a pyridinové deriváty typu thioamidů ethionamid a protionamid, které dnes slouží jako léčiva druhé volby. [18]



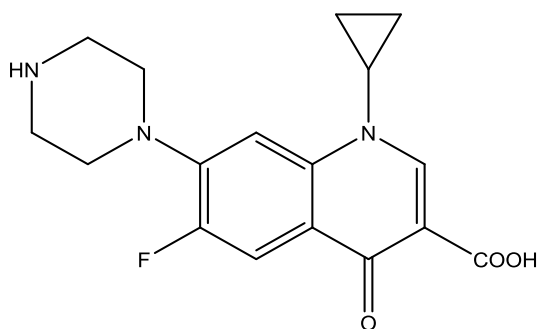
*kyselina p-aminosalicylová*



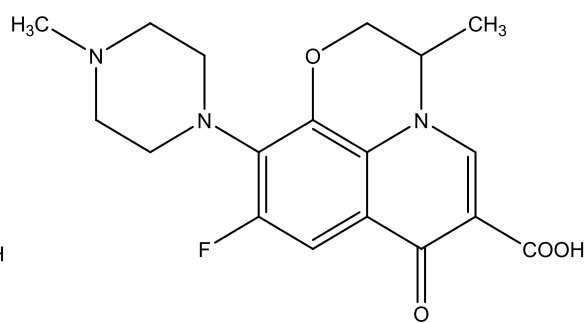
*ethionamid (R=ethyl)*

*protionamid (R=propyl)*

Mezi další významné látky, které se v terapii používají dodnes, patří látka typu aminoalkoholu ethambutol, ansamycinové antibiotikum rifampicin a jeho deriváty rifabutin, rifapentin a rifalazil. Antituberkulotický účinek byl objeven i u některých dalších antibiotik, jako například aminoglykosid streptomycin nebo fluorované chinolony ciprofloxacin a ofloxacin. [18]



*ciprofloxacin*



*ofloxacin*

Terapie tuberkulózy v současnosti zahrnuje kombinaci více látek, aby se zajistila účinnost léčby a předešlo se možnému selhání léčby zapříčiněnému rezistencí mykobakterií na použitá antituberkulotika. Léčba je dlouhodobá, trvá minimálně šest měsíců. První dva měsíce se obvykle podává čtyřkombinace antituberkulotik (isoniazid, rifampicin, ethambutol a pyrazinamid) a léčba probíhá v ústavní péči. Poté následuje pokračovací terapie po dobu minimálně čtyř měsíců, ale může být i delší dle vývoje onemocnění a účinnosti léčby u pacienta. Tato fáze léčby může probíhat i v ambulantní péči a zahrnuje obvykle dvojkombinaci látek, případně ve výjimečných případech i trojkombinaci (relaps onemocnění, selhání dřívější terapie). [13]

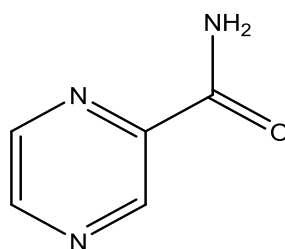
Závažným problémem při terapii TBC je rezistence mykobakterií vůči stávajícím antituberkulotikům, především těch první volby. Pro tyto případy jsou vyhrazena léčiva druhé volby. Jako multirezistentní (MDR-TBC) označujeme tuberkulózu, pokud je její původce rezistentní vůči alespoň dvěma léčivům první linie (většinou isoniazidu a rifampicinu). Ještě závažnějším problémem je tzv. extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TBC), kdy jsou mykobakterie kromě isoniazidu a rifampicinu odolné také vůči dalším minimálně třem léčivům z druhé linie – tedy vůči kyselině *p*-aminosalicylové, aminoglykosidům, polypeptidům, fluorochinolonům nebo thioamidům. [11]

### 5.2.1 Antituberkulotika 1. volby

#### 5.2.1.1 Pyrazinamid

Pyrazinamid se s výhodou podává během prvních dvou až tří měsíců léčby, protože zkracuje dobu léčby a také snižuje pravděpodobnost recidivy. Používá se pouze v kombinacích s ostatními léčivy, protože si na něj mykobakterie vytváří velmi rychle rezistenci. Mechanismus jeho působení je nejistý, předpokládá se několik možných cílů jeho působení. Pyrazinamid přestupuje přes membránu a v cytoplazmě se přeměňuje na aktivní formu, pyrazin-2-karboxylovou kyselinu, která poté nejspíš způsobuje acidifikaci cytoplazmy. Kromě toho se také váže na ribozomální protein a inhibuje trans-translaci. Dalším možným místem působení pyrazinamidu je syntéza mastných kyselin a fosfátový metabolismus. Mezi jeho nejzávažnější nežádoucí účinky patří hepatotoxicita a snížení vylučování kyseliny močové, z těchto důvodů je tedy kontraindikován u pacientů se závažným poškozením jater a s akutní dnou. [19, 20]

Vzhledem k úspěchu pyrazinamidu v léčbě velice brzy po jeho objevu následovaly snahy o vytvoření aktivní jemu podobné látky. Náhrada pyrazinového jádra jiným heteroaromatickým kruhem se neprojevila úspěšně, nicméně substituce původního jádra přinesla výsledky. V současné době se na FaF UK zkoumá vliv různých substitucí pyrazinu na jeho antimykobakteriální aktivitu. [18]



*pyrazinamid*

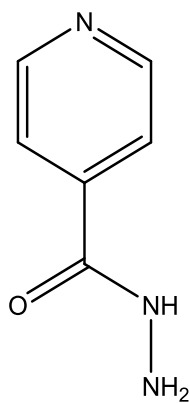


### 5.2.1.2 Isoniazid

Isoniazid (hydrazid pyridin-4-karboxylové kyseliny) je jednou z nejvýznamnějších antituberkulotických látek, používá se téměř ve všech léčebných režimech v kombinaci s ostatními. Kromě léčby se používá také jako prevence u osob, které se mykobakteriemi nakazily, ale neprojevila se u nich tuberkulóza. Další možností použití je profylaxe u osob, které se dostaly do kontaktu s infikovaným pacientem, ale snažíme se zabránit nákaze původcem onemocnění. [19]

Pro jeho účinek je nezbytná přeměna na účinnou formu, kyselinu isonikotinovou. Ta poté působí na koenzym NAD a tím způsobuje inhibici syntézy kyseliny mykolové, která je součástí buněčné stěny mykobakterií. Hlavní nežádoucí účinky isoniazidu jsou projevy poškození centrálního nervového systému, tedy převážně závratě, bolesti hlavy, svalové záškuby a parestezie. Těmto potížím se předchází současnou suplementací vitamínu B<sub>6</sub>. Kromě CNS isoniazid poškozuje také játra, toto riziko je zvýšené u pomalých acetylátorů, u kterých se jeho metabolity vylučují pomaleji, více se tedy kumulují a jsou pro pacienta toxičtější. Z důvodu hepatotoxicity je tedy kontraindikován u pacientů s akutním jaterním onemocněním. [19]

Isoniazid byl už dříve centrem zájmu při výzkumu nových možností léčby, nicméně se nepovedlo objevit jiný jeho účinný derivát. K budoucímu výzkumu ale jistě přispěla i zjištění, že záměna pyridinového jádra nebo jeho substituce nemá žádný přínos, stejně tak i příprava derivátů jiných pyridinkarboxylových kyselin. Bez úspěchu byla také záměna hydrazidové skupiny, i když její substituce přinesla účinný derivát iproniazid, který má kromě antimykobakteriálního účinku také schopnost inhibovat monoaminoxidasu a tím snižovat deprese. [18]

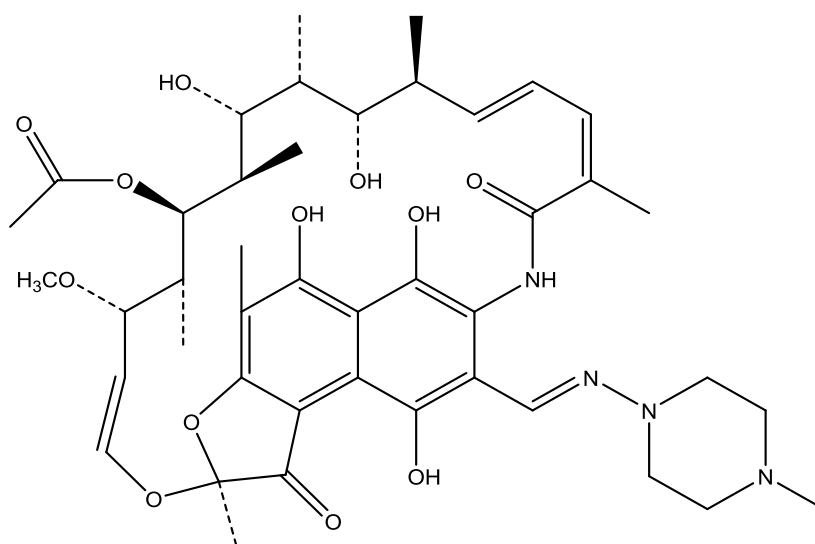


*isoniazid*

### 5.2.1.3 Rifampicin

Rifampicin patří mezi ansamycinová antibiotika, je zástupcem skupiny rifamycinů, jejichž společným znakem je naftalenové jádro jako základ struktury. Rifampicin je z této skupiny látek nejpoužívanější, mezi další používaná léčiva patří například rifabutin a rifapentin, nicméně mezi všemi těmito látkami existuje zkřížená rezistence, není je tedy možné použít při výskytu rezistence na jednu z nich. Využití všech těchto látek je především v terapii TBC, i když spektrum jejich působení je širší. Rifampicin působí baktericidně na grampozitivní i gramnegativní bakterie, chlamydie, rickettsie a některé anaerobní bakterie. [18]

Mechanismem jeho účinku je blokáda syntézy bakteriální RNA přes inhibici DNA-dependentní RNA-polymerasy. Mezi časté nežádoucí účinky terapie rifampicinem patří hepatotoxicita (spíše lehčí forma, těžké poškození jater je výjimečné), poruchy CNS, kožní reakce a poruchy zažívání. Pro léčbu rifamyciny je také typické žlutočervené zbarvení exkretů – moči, sputa, slin a slz. [19]

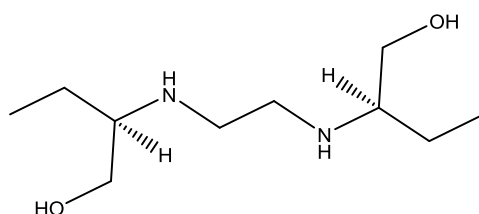


*rifampicin*

### 5.2.1.4 Ethambutol

Ethambutol je bakteriostaticky působící antituberkulotikum ze skupiny derivátů ethylendiaminu. Bylo zjištěno, že jeho jedinou aktivní formou je *S,S*(+)-izomer, protože levotočivý izomer je vůči mykobakteriím neúčinný a stereoizomery jsou dokonce toxické. V rámci výzkumu nových antituberkulotik byla také snaha o objevení účinných derivátů ethambutolu, nicméně bez většího úspěchu. Testovala se substituce postranního ethylu za aromatický substituent nebo methoxy- či ethoxyskupinu, žádný tento derivát ale neměl větší aktivitu. [18]

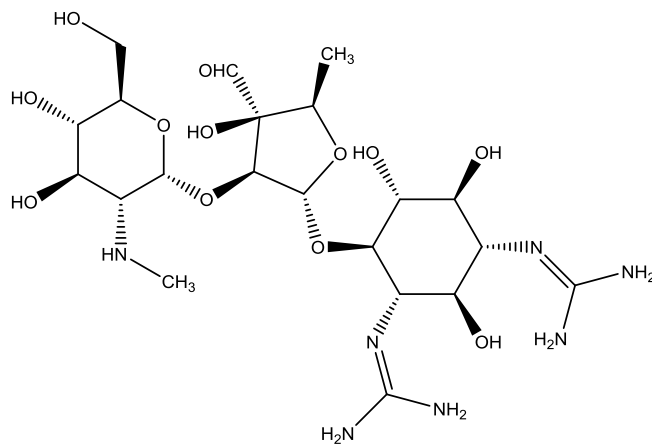
Ethambutol působí na syntézu buněčné stěny mykobakterií, narušuje její celistvost. Používá se pouze v kombinaci s ostatními antituberkulotiky, a to především tehdy, vyskytla-li se rezistence na ostatní léčiva. Nežádoucí účinky se u něj neobjevují často, ale mohou nastat alergické reakce, leukopenie, poškození ledvin, záchvaty dny v důsledku sníženého vylučování kyseliny močové nebo poruchy zraku (poruchy ostrosti vidění, omezení zorného pole a poruchy barvocitu). [19]



*ethambutol*

#### 5.2.1.5 Streptomycin

Streptomycin je dalším antituberkulotikem patřícím mezi antibiotika, přesněji aminoglykosidy. Je přírodního původu, produkují jej aktinomycety *Streptomyces griseus*. Nepatří mezi základní terapeutické kombinace, používá se jako doplňkové léčivo do kombinací, občas také bývá řazen mezi antituberkulotika druhé volby. *M. tuberculosis* si na něj navíc rychle vytváří rezistenci, není proto vhodné aplikovat jej v monoterapii. Streptomycin působí baktericidně, místem jeho účinku je proteosyntéza bakterií. Ve vyšších koncentracích vyvolává syntézu falešných bílkovin, které po vestavění do membrány bakterie narušují její propustnost. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je ototoxicita. Dochází k poškození vestibulárního i kochleárního aparátu, což je způsobeno poškozením nervus acusticus. Výsledkem mohou být nejružnější sluchové vjemy (hučení, šelesty) až úplná hluchota. Toto poškození je bohužel ireverzibilní. Dalším závažným nežádoucím účinkem je nefrotoxicita. [18, 19]



*streptomycin*

### 5.2.2 Antituberkulotika 2. linie

Tato léčiva se používají především při rezistenci na antituberkulotika první volby.

Kyselina *p*-aminosalicylová je jednou z nejstarších látek používaných v terapii TBC. V současnosti se ve vyspělých zemích používá jen minimálně. [14, 18]

Protionamid a ethionamid jsou thioamidy isonikotinové kyseliny. Působí na syntézu mykolové kyseliny, čímž poškozují stavbu buněčné stěny mykobakterií. Používají se pouze jako léčiva druhé volby kvůli vysoké toxicitě a rychlému vývoji rezistence. [14, 18]

Z dalších antibiotik používaných v léčbě TBC zde můžeme jmenovat aminoglykosidy kanamycin a jeho polosyntetický derivát amikacin, fluorochinolony ciprofloxacin a ofloxacin a makrolid klarithromycin. [14, 18]

### 5.2.3 Vývoj nových léčiv

Při terapii tuberkulózy je jedním z největších problémům častý výskyt rezistence na již existující léčiva, vývoj nových antituberkulotik je tedy celosvětově velmi aktuální a potřebný. Cílem výzkumu je především objevení látek, které budou vykazovat vysokou aktivitu a zároveň si udrží poměrně nízkou toxicitu na lidský organismus. Aktuálně jsou v různých fázích klinických studií léčiva, u kterých byl zjištěn potenciál pro budoucí využití v terapii.

V rámci celého světa funguje sdružení The Stop TB Partnership, které spojuje přes 100 zemí s cílem společného boje proti TBC. Jednou z pracovních skupin tohoto sdružení je také The Working Group on New TB Drugs (NTBD), jejímž cílem je celosvětově vést a organizovat právě vývoj nových účinných a bezpečných antituberkulotik. Díky této skupině byl také vytvořen přehled aktuálně zkoumaných látek (viz Tab. 1). [21]

**Tab. 1:** Přehled látek v současném výzkumu. Převzato z *The Working Group on New Drugs*. [22]

| Preklinické testování | Fáze 1                               | Fáze 2   | Fáze 3     |
|-----------------------|--------------------------------------|--|------------|
| BTZ 043               | makozinon (PBTZ-169)<br>iM4TB (svět) | makozinon (PBTZ-169)<br>Nearmedic Plus (Rusko) | bedachilin |
| TBAJ-587              | TBI-166                              | SQ109  | delamanid  |
| TBI-223               | OPC-167832                           | delpazolid<br>(LCB01-0371)                     |            |
| spektinamid 1810      | TBA-7371                             | sutezolid                                      |            |
| CPZEN-45              | Q203                                 |  |            |
| SPR-720               | GSK-656 (GSK 070)                    |  |            |
| TB-47                 |                                      |  |            |
| DC-159a               |                                      |  |            |
| GSK-286               |                                      |  |            |

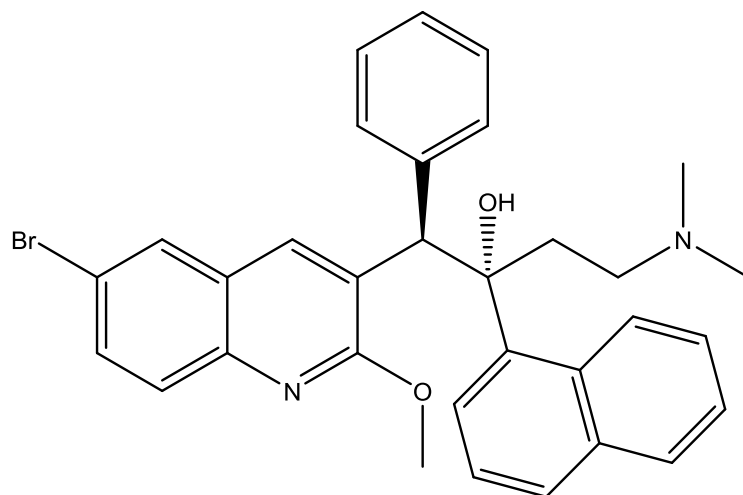
**pozn.:** obě léčiva uvedená ve fázi 3 jsou aktuálně registrována a užívána v terapii TBC, v třetí fázi klinického hodnocení jsou podrobnější studie především na jejich kombinaci s ostatními látkami

#### 5.2.3.1 Bedachilin

Bedachilin patří mezi diarylchinoliny. Na mykobakterie působí baktericidně inhibicí ATP-syntasy. Rezistenci na něj si mykobakterie vyvíjí přes mutaci genu *atpE*, který se podílí na kódování ATP-syntasy. Tato rezistence ale není zkřížená s ostatními antituberkulotiky kromě klofaziminu. [23]

Mezi hlavní nežádoucí účinky bedachilinu patří nevolnost, bolest kloubů a hlavy, poškození jater a prodloužení QT intervalu. Kvůli poslednímu nežádoucímu účinku by se tedy neměl kombinovat s ostatními látkami prodlužujícími QT interval (z antituberkulotik tedy například s klofaziminem, delamanidem a fluorochinolony, především moxifloxacinem). [23]

K terapii MDR-TBC byl oficiálně schválen nejprve FDA v prosinci 2012 a v březnu 2014 jej schválila také EMA. [23] Nedávno byly provedeny testy na jeho kyanoderivátech a bylo zjištěno, že je zachována podobná účinnost, ale podstatně se snížila lipofilita, což by mohlo vést ke snížení nežádoucích účinků. [24] Byly také nasyntetizovány deriváty, u kterých došlo k záměně fenylu za monocyklické heterocykly, nedošlo ale ke zvýšení antimykobakteriální aktivity. [25]

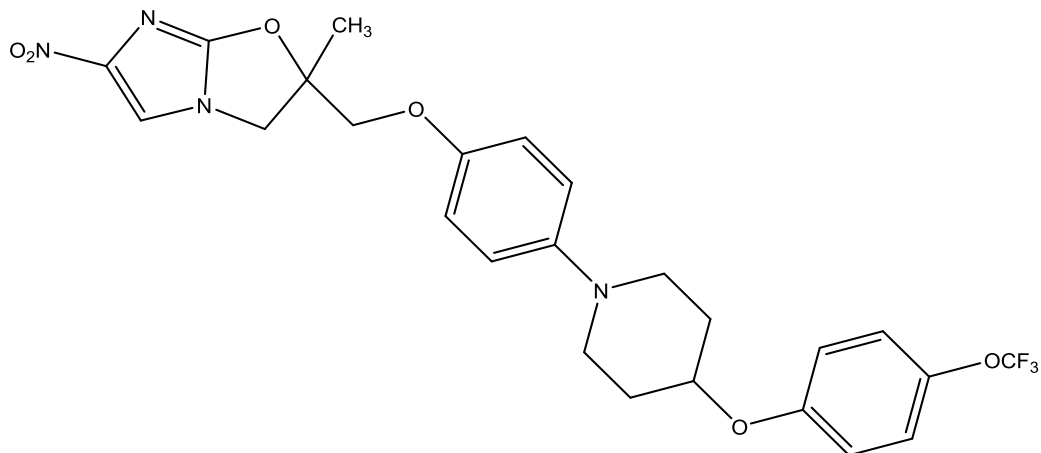


*bedachilin*

### 5.2.3.2 Delamanid

Delamanid se chemicky řadí do skupiny nitrodihydroimidazooxazolů. Je to proléčivo, po přeměně na aktivní formu inhibuje syntézu mykolové kyseliny a tím narušuje stavbu buněčné stěny mykobakterií. Jeho nejzávažnějším nežádoucím účinkem je prodloužení QT intervalu a je tedy nevhodný do kombinace s klofaziminem, bedachilinem a fluorochinolony, jak bylo zmíněno výše. [23]

Delamanid je dalším novým lékem, který EMA schválila k léčbě MDR-TBC, a to v listopadu 2013. [26]



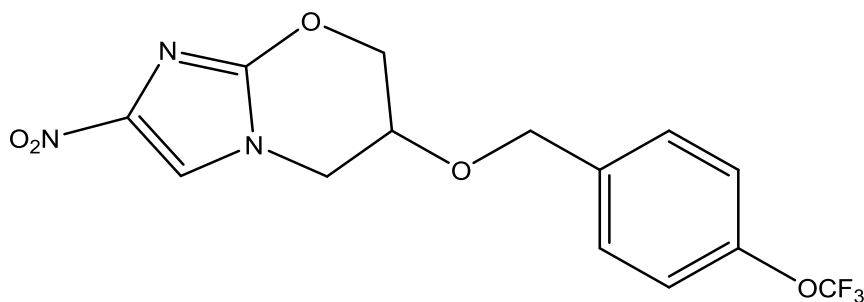
*delamanid*

### 5.2.3.3 Pretomanid (PA-824)

Pretomanid patří mezi nitroimidazoly a je obdobně jako delamanid také proléčivem. Jeho mechanismus účinku je odlišný za aerobních a anaerobních podmínek. V aerobním prostředí (spíše perzistentní nemnožící se bakterie) působí podobně jako isoniazid, tedy inhibuje syntézu mykolové kyseliny. V anaerobním prostředí (aktivní

množící se bakterie) se při přeměně na aktivní formu uvolňují dusíkaté plyny, dochází k poklesu ATP a tím k usmrcení mikroorganismů. [23]

Pretomanid vykazuje téměř stejnou aktivitu v počátečních stádiích léčby jako již výše zmíněný delamanid. [27] Momentálně se nachází v třetí fázi klinického testování v kombinaci s bedachilinem a linezolidem. [28]

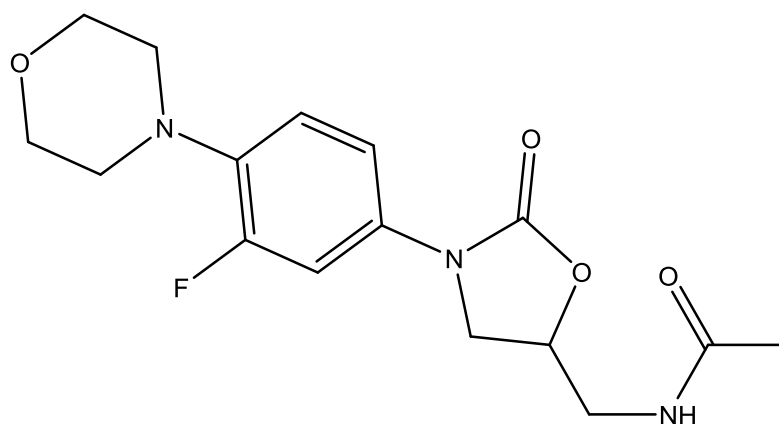


*pretomanid (PA-824)*

#### 5.2.3.4 Linezolid

Linezolid je látkou ze skupiny oxazolidinonů. Celá tato skupina má obdobný mechanismus účinku, a to inhibici mykobakteriální proteosyntézy. Linezolid je sice účinný na mykobakterie, nicméně vykazuje závažné nežádoucí účinky, jako například periferní neuropatii a myelosupresi, a to především při dlouhodobém podávání. [29]

Jeho výhodou je nízký výskyt rezistence. Ta se objevila jen velmi vzácně a až po delším užívání. [27] Byla provedena studie, která měla za cíl odhalit ideální dávku pro zachování dostatečné účinnosti a zároveň minimalizaci nežádoucích účinků. Výsledkem byla zjištěná doporučená denní dávka 300 mg linezolidu, nicméně při těchto nižších dávkách se zvyšuje riziko vzniku rezistence. [30]

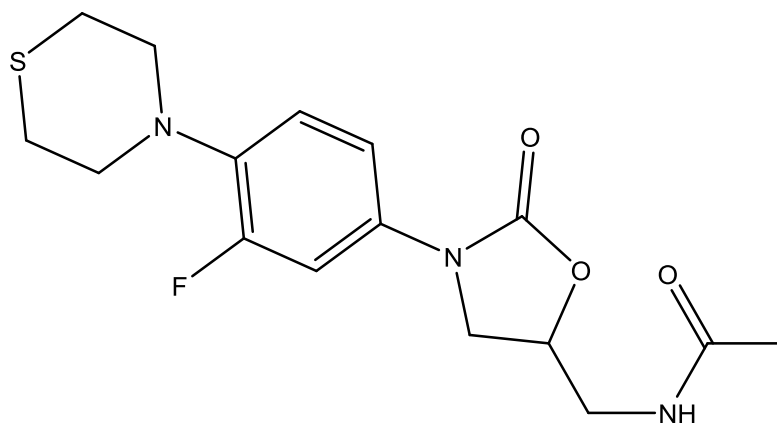


*linezolid*

### 5.2.3.5 Sutezolid

Sutezolid je derivát linezolidu a byl vyvinut se záměrem získat látku s vyšší aktivitou a nižší toxicitou, než vykazuje právě linezolid. [23] Ve srovnání s ním je u sutezolidu MIC 3,2× nižší. [31] Stejně jako u ostatních oxazolidindionů je jeho mechanismem účinku inhibice proteosyntézy mykobakterií. [32]

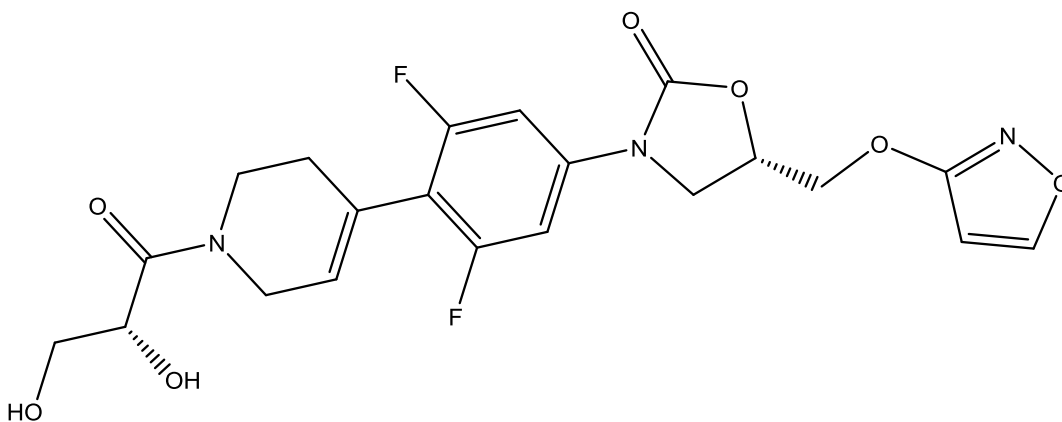
U sutezolidu proběhla druhá fáze klinického testování. Z této studie vyplývá, že po podání nedochází k poruchám krvetvorby ani prodloužení QT intervalu. Jedním z projevů nežádoucích účinků bylo zvýšení alaninaminotransferas (ALT) a aspartátaminotransferas (AST), sutezolid tedy vykazuje možnou hepatotoxicitu. [32]



*sutezolid*

### 5.2.3.6 Posizolid (AZD5847)

Také posizolid se řadí mezi oxazolidindiony a jeho mechanismem účinku je tedy inhibice proteosyntézy. Ve srovnání s linezolidem vykazuje vyšší mykobakteriální aktivitu, jeho doposud zjištěným častým nežádoucím účinkem je především nevolnost. Momentálně se nachází v druhé fázi klinického testování. [23]



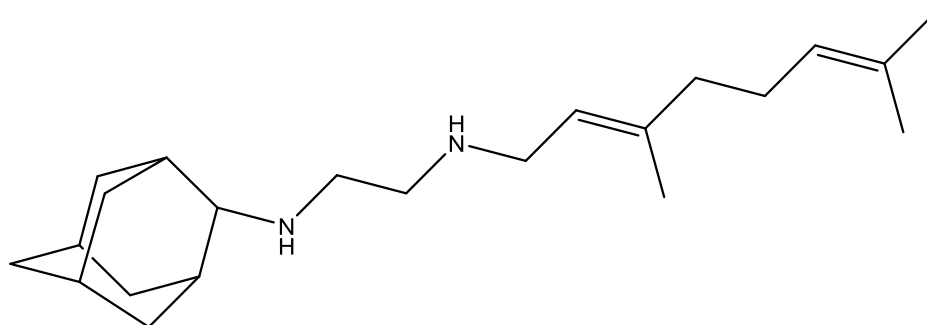
*posizolid (AZD5847)*



### 5.2.3.7 SQ109

SQ109 je strukturálně podobný ethambutolu, je to derivát 1,2-ethylendiaminu. Má ale částečně odlišný mechanismus účinku, i když cílem jeho působení je také mykobakteriální buněčná stěna. I přes strukturální podobnost ale SQ109 působí i na mykobakterie, které jsou vůči ethambutolu rezistentní. [23]

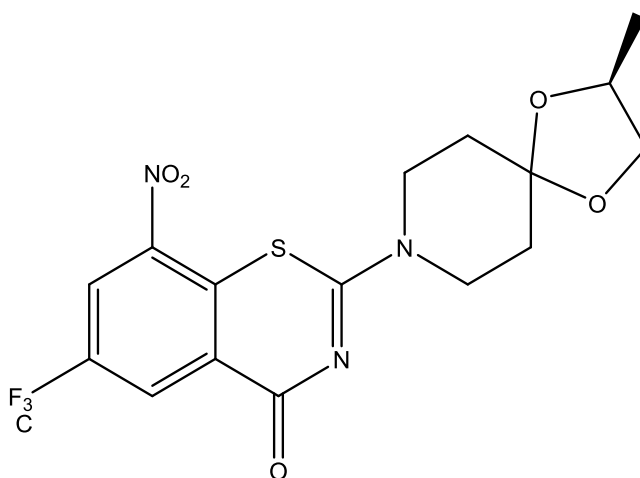
Během klinické studie bylo zjištěno, že při kombinaci s rifampicinem je potřeba podávat vyšší dávky SQ109. Rifampicin totiž působí jako induktor CYP2C19, který se podílí na metabolizaci SQ109, a tím dochází k rychlejšímu odbourávání léčiva z organismu. [33]



SQ109

### 5.2.3.8 BTZ043

BTZ043 je jedna z nejslibnějších látek ze skupiny benzothiazinů, působí i na mykobakterie rezistentní na antituberkulotika první volby. Inhibuje syntézu dekaprenylfosfoarabiny, která je pro mykobakterie nezbytná pro stavbu buněčné stěny. Byla provedena klinická studie na kombinaci BTZ043 s dalšími antituberkulotiky a bylo zjištěno, že mezi nimi nedochází k nežádoucím interakcím, naopak dochází k jejich synergickému působení. [29]



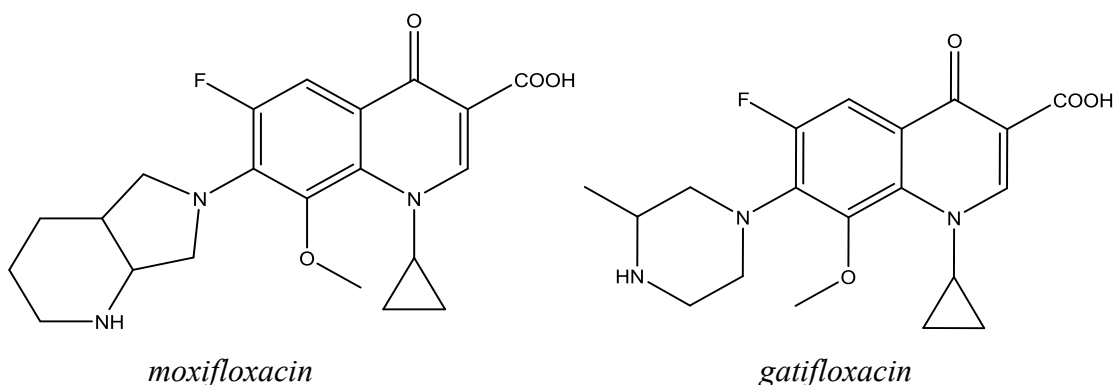
BTZ043

### 5.2.3.9 Fluorochinolony (*moxifloxacin*, *gatifloxacin*)

Některá léčiva ze skupiny fluorochinolonů (*ciprofloxacin*, *ofloxacin*) se v současnosti používají jako antituberkulotika druhé volby. U dalších látek se zkoumá jejich účinnost na *Mycobacterium tuberculosis* a vhodnost při terapii TBC. [27] U *moxifloxacinu* a *gatifloxacinu* se projevila vyšší aktivita než u již používaných fluorochinolonů. [31]

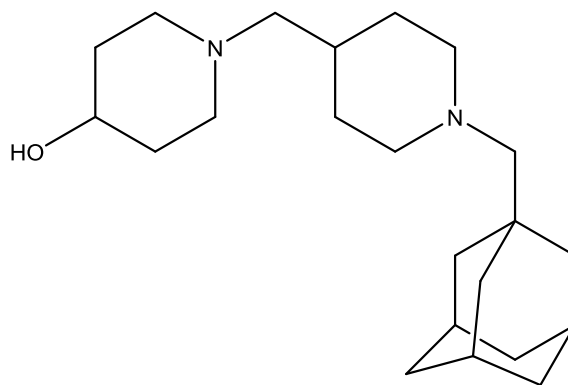
Během studie, kdy se *moxifloxacin* podával v kombinaci s *bedachilinem*, *pretomanidem* a *pyrazinamidem*, bylo zjištěno, že hlavním přínosem *moxifloxacinu* je snížení rizika relapsu onemocnění. [34]

Z dalších studií vyplynulo, že *moxifloxacin* je vhodný jako léčivo druhé volby společně s již užívanými fluorochinolony. [35] Také bylo zjištěno, že i když mají *moxifloxacin* a *gatifloxacin* nejsilnější aktivitu na počátku léčby, není vhodné je používat ve zkráceném léčebném režimu. [36]



### 5.2.3.10 SQ609

Jedná se o derivát hydroxydipiperidinu, u kterého byla objevena antimykobakteriální aktivita při testování větší skupiny látek obsahujících ve své struktuře dipiperidin. [31, 37] Díky své vysoké aktivitě je vhodným kandidátem pro další výzkum. [31]

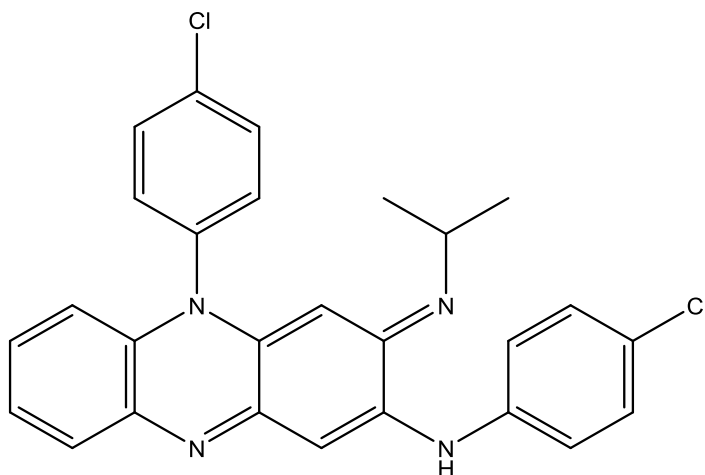


*SQ609*

### 5.2.3.11 Klofazimin

Klofazimin patří do skupiny riminofenazinů a byl původně vyvinut pro léčbu TBC, používá se ale spíše v terapii lepry. [29, 38] Pro jeho častější použití v léčbě je ale překážkou dlouhý biologický poločas a vysoká kumulace v tukové tkáni. [39]

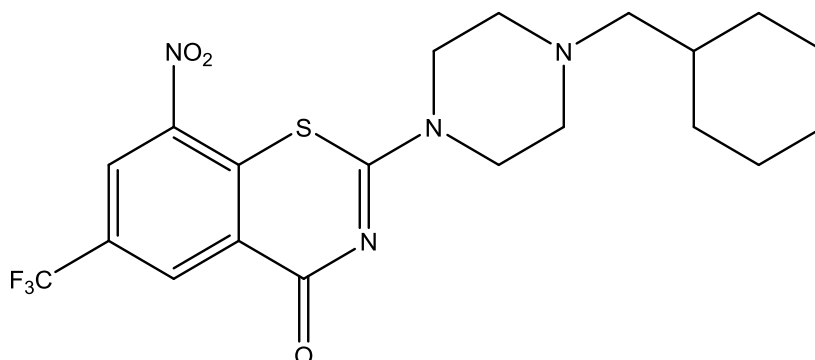
Jeho mechanismus účinku nebyl přesně vysvětlen, ale předpokládá se působení na buněčnou membránu. Aktuálně se zkoumá možnost jeho využití v léčbě infekcí způsobených netuberkulózními mykobakteriemi. [38]



*klofazimin*

### 5.2.3.12 Makozinon (PBTZ-169)

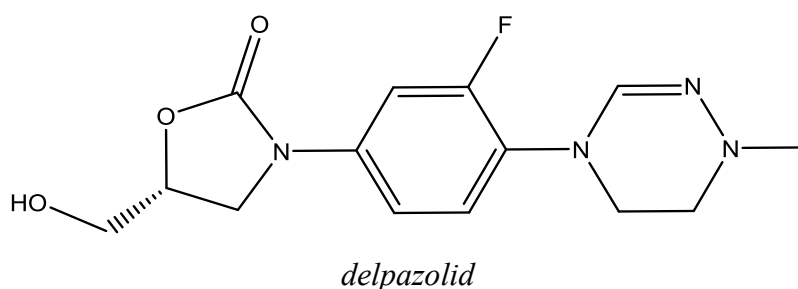
Makozinon se řadí mezi benzothiaziny, ve své struktuře navíc obsahuje navázaný piperazin. Byl vyvinut jako derivát BTZ043 a bylo zjištěno, že má vyšší účinnost a je bezpečnější. Výsledkem studie také bylo zjištění, že je vhodný do kombinací například s bedachilinem nebo klofaziminem, kdy vykazuje synergické působení. [40, 41]



*makozinon (PBTZ-169)*

### 5.2.3.13 Delpazolid (LCB01-0371)

Delpazolid je dalším léčivem ze skupiny oxazolidindionů. Působí na většinu gram-pozitivních mikroorganismů, mechanismem jeho účinku je inhibice proteosyntézy. [42] Byla provedena studie na potvrzení nebo vyvrácení podezření na myelosupresi jako možného nežádoucího účinku. U zdravých jedinců se tento jev neprojevil. [43]



### 5.2.3.14 Další možnosti léčby

Kromě výzkumu nových látek, který je poměrně časově náročný, jsou možným zdrojem nových léčiv na TBC také již existující látky, které se používají v jiných indikacích, ale projevily také určitou aktivitu proti *M. tuberculosis* (viz Tab. 2). Tato léčiva se mohou sama stát novými antituberkulotiky nebo může dojít k jejich strukturní úpravě za účelem vylepšení jejich aktivity nebo bezpečnosti. [44]

**Tab. 2:** Přehled léčiv s antimykobakteriální aktivitou

| chemická skupina | název látky  | in vitro |                       | in vivo aktivita      |
|------------------|--------------|----------|-----------------------|-----------------------|
|                  |              | aktivita | MIC (µg/ml)           |                       |
| fenothiazin      | thioridazin  | +        | 2,5                   | +                     |
| nitroimidazol    | metronidazol | +/-      | <del>          </del> | -                     |
| tetracyklin      | doxycyklin   | -        | 8–64                  | <del>          </del> |
|                  | tigecyklin   | +/-      | 2,5                   | +                     |
| sulfhydryl       | disulfiram   | +        | 8                     | +                     |
| sulfonamid       | kotrimoxazol | +        | 1/19                  | <del>          </del> |

+ látka má antimykobakteriální aktivitu

- látka nemá antimykobakteriální aktivitu

## 6. Experimentální část

### 6.1 Přístroje a chemikálie

Použité chemikálie byly produkty firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo).

K průběhu reakce byl použit CDM Discover mikrovlnný reaktor s fokusovaným polem (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) spojený s autosamplerem Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA), opatřený pro nastavení a monitorování reakčních podmínek softwarem Synergy™ (version 1.38).

K přečištění produktů byl použit preparativní flash chromatograf CombiFlash® Rf (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA), během gradientové eluce byla používána jako mobilní fáze směs rozpouštědel hexanu (LachNer, Neratovice, Česká republika) a ethyl-acetátu (Penta, Praha, Česká republika) a jako stacionární fáze byl použit silikagel (0.040–0.063 nm, Merck, Německo).

Čistota produktů byla testována pomocí TLC, použity byly desky TLC Silica gel (60 F254, Merck, Darmstadt, Německo) s UV detekcí o vlnové délce 254 nm.

<sup>1</sup>H-NMR a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla měřena v DMSO-d<sub>6</sub> pomocí spektrometru Varian VNMR S500 (499.87 MHz pro <sup>1</sup>H a 125.71 MHz pro <sup>13</sup>C; Varian Corporation, Palo Alto, CA, USA), chemické posuny jsou uváděny v jednotkách ppm (δ) a jsou vztaženy nepřímo k tetramethylsilanu. Měření prováděl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. na Katedře organické a bioorganické chemie FaF UK.

IR spektra byla měřena pomocí spektrometru FT-IR Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) za pomoci ATR (attenuated total reflectance) na krystalu germania.

Elementární analýza byla měřena na přístroji Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo).

Teploty tání byly stanoveny pomocí bodotávku SMP3 Stuart Scientific (Bibby Sterling Ltd., Staffordshire, Velká Británie), uváděné teploty tání jsou nekorigované.

Chemické vzorce byly vytvořeny pomocí programu ChemDraw verze 16.0 (PerkinElmer Informatics, Waltham, Massachusetts, USA).

Teoretická hodnota lipofility log*P* byla vypočítána pomocí programu CS ChemBioDraw Ultra (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA).

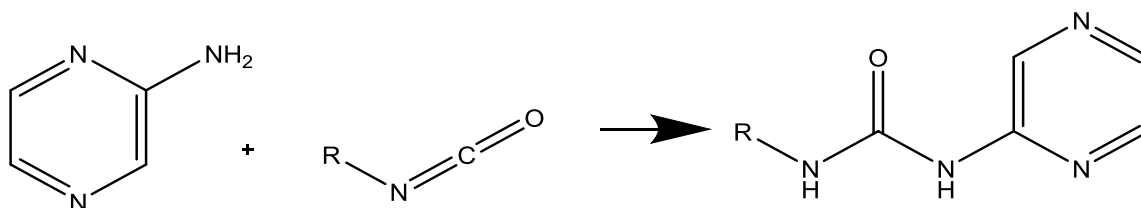
## 6.2 Úvod do experimentální části a obecný postup přípravy

Arylové deriváty močoviny mají prokázaný antikonvulzivní, protizánětlivý, antivirový a antimikrobiální účinek. [45] V dříve vydaném patentu je uvedeno, že alkylové deriváty močoviny mají protizánětlivý účinek [46], je tedy možné, že díky vhodné substituci by i alkylové deriváty mohly působit proti mikroorganismům, obdobně jako výše zmíněné arylové deriváty.

Pro syntézu látek v této diplomové práci byl převzat a upraven reakční postup z uvedeného patentu. V něm byla popsána reakce aminopyrazinu s ethylisokyanátem za několikahodinového míchání. [46] Pro naši syntézu se jako úspěšně ukázalo využití mikrovlnné syntézy, protože došlo k několikanásobnému zkrácení reakčního času.

Pro přípravu látek byly do reakční zkumavky naváženy 2 mmol aminopyrazinu a 2 mmol daného isokyanátu a jako rozpouštědlo byly přidány 3 ml hexanu. Poté se do zkumavky vložilo míchadlo a reakční zkumavka se umístila do mikrovlnného reaktoru (reakční podmínky: teplota 120 °C, reakční čas 1 hodina, výkon 80 W). Průběh reakce byl testován pomocí TLC s použitím směsi hexan/ethyl-acetát v poměru 1:3 jako mobilní fáze. Produkt byl následně naadsorbován na silikagel a přečištěn na automatickém flash chromatografu za použití gradientové eluce 20–100 % ethyl-acetátu v hexanu. Čistota látky po flash chromatografii byla ověřena pomocí TLC (mobilní fáze viz výše) a pokud bylo nadále potřeba produkt přečistit, byla použita rekrystalizace ze směsi ethanolu a vody.

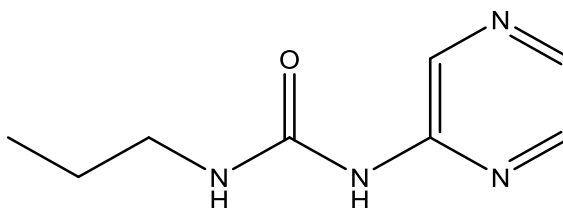
Výsledný produkt byl charakterizován pomocí NMR spekter, IR spekter, teploty tání a elementární analýzy.



*obecné schéma přípravy nových látek*

## 6.3 Přehled nově připravených sloučenin a jejich vlastností

### 6.3.1 *N*-propyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina



**Vzhled:**

světle žlutá krystalická látka

**Sumární vzorec:**

C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O

**Molekulová hmotnost:**

180,21 g/mol

**Teplota tání:**

104,6–107,1 °C

**Výtěžnost reakce:**

36 %

**Elementární analýza (%):**

vypočítaná C, 53.32; H, 6.71; N, 31.09

nalezená C, 53.68; H, 6.72; N, 30.89

**log*P*:**

-0,28

**IR spektrum (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>):**

3274 (-NH-), 2693 (-CH<sub>2</sub>-), 1694 (-C=O), 1586, 1536, 1499 (arom.)

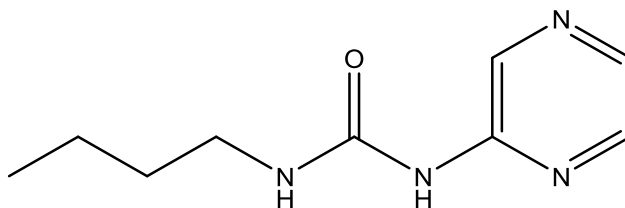
**<sup>1</sup>H NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 10.19 (s, 1H, urea), 8.90 (s, 1H, urea), 8.44 (d, *J*=1.4 Hz, 1H, pyrazin), 8.14–8.04 (m, 2H, pyrazin), 3.44–3.33 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.70–1.61 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 0.99 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 154.5, 153, 139.5, 137.3, 136.1, 41.3, 22.7, 10.9

### 6.3.2 *N*-butyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina



**Vzhled:**

světle žlutá až nahnědlá krystalická látka

**Sumární vzorec:**

C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O

**Molekulová hmotnost:**

194,24 g/mol

**Teplota tání:**

107,8–108,5 °C

**Výtěžnost reakce:**

29 %

**Elementární analýza (%):**

vypočítaná C, 55.65; H, 7.27; N, 28.85

nalezená C, 55.34; H, 7.21; N, 28.31

**log*P*:**

0,13

**IR spektrum (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>):**

3276 (-NH-), 2953 (-CH<sub>2</sub>-), 1688 (-C=O), 1600, 1553, 1502 (arom.)

**<sup>1</sup>H NMR:**

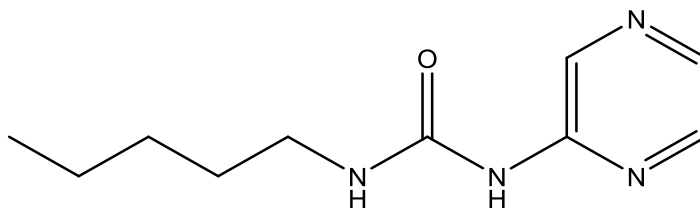
(CDCl<sub>3</sub>) δ 10.16 (s, 1H, urea), 8.91 (s, 1H, urea), 8.42 (d, *J*=1.5 Hz, 1H, pyrazin), 8.14–8.04 (m, 2H, pyrazin), 3.45–3.37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.66–1.57 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.53–1.33 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 0.97 (t, *J*=7.4 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 156.2, 145, 139.3, 136.4, 136.3, 39.7, 31.9, 20.1, 13.8



### 6.3.3 *N*-pentyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina



**Vzhled:**

žlutá krystalická látka

**Sumární vzorec:**

C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O

**Molekulová hmotnost:**

208,27 g/mol

**Teplota tání:**

108–110 °C

**Výtěžnost reakce:**

51 %

**Elementární analýza (%):**

vypočítaná C, 57.67; H, 7.74; N, 26.91

nalezená C, 58.78; H, 7.95; N, 26.62

**log*P*:**

0,55

**IR spektrum (ATR-Ge, cm<sup>-1</sup>):**

3258 (-NH-), 2955 (-CH<sub>2</sub>-), 1686 (-C=O), 1618, 1599, 1501 (arom.)

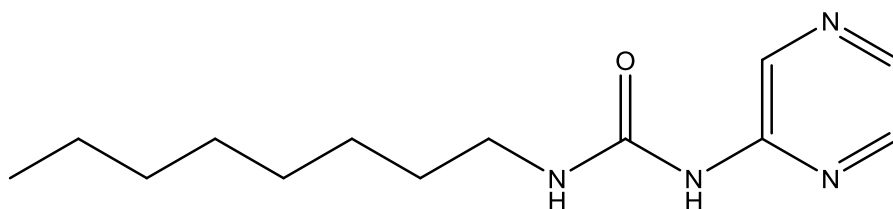
**<sup>1</sup>H NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 10.19 (s, 1H, urea), 8.90 (s, 1H, urea), 8.43 (d, *J*=8.2 Hz, 1H, pyrazin), 8.13–8.04 (m, 2H, pyrazin), 3.44–3.36 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.44–1.31 (m, 6H, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-), 0.92 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 156.2, 150, 139.3, 136.4, 40, 29.6, 29.1, 22.3, 14

### 6.3.4 *N*-oktyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina



**Vzhled:**

bílá krystalická látka

**Sumární vzorec:**

$C_{13}H_{22}N_4O$

**Molekulová hmotnost:**

250,35 g/mol

**Teplota tání:**

115,6–117,2 °C

**Výtěžnost reakce:**

43 %

**Elementární analýza (%):**

vypočítaná C, 60.99; H, 8.53; N, 23.71

nalezená C, 60.39; H, 8.42; N, 23.23

**log*P*:**

1,8

**IR spektrum (ATR-Ge,  $cm^{-1}$ ):**

3276 (-NH-), 2929 (-CH<sub>2</sub>-), 1699 (-C=O), 1552, 1535, 1503 (arom.)

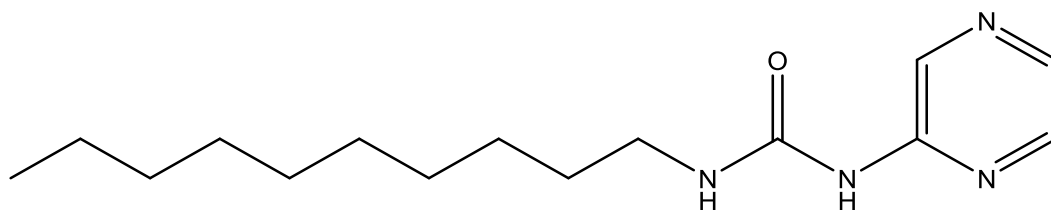
**<sup>1</sup>H NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 10.21 (s, 1H, urea), 8.91 (s, 1H, urea), 8.43 (d, *J*=2.8 Hz, 1H, pyrazin), 8.11 (d, *J*=2.8 Hz, 1H, pyrazin), 8.07 (dd, *J*=2.8, 1.4 Hz, 1H, pyrazin), 3.40 (td, *J*=7.1, 5.5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.67–1.57 (m, 4H, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-), 1.43–1.37 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.40–1.26 (m, 4H, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-), 1.30–1.21 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 0.91–0.84 (m, 3H, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 156.2, 150, 139.3, 136.3, 136.4, 136.3, 40, 31.8, 29.8, 29.2, 29.1, 27, 22.6, 14

### 6.3.5 *N*-decyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina



**Vzhled:**

žlutá krystalická látka

**Sumární vzorec:**

$C_{15}H_{26}N_4O$

**Molekulová hmotnost:**

278.40 g/mol

**Teplota tání:**

121,3–123,5 °C

**Výtěžnost reakce:**

24 %

**Elementární analýza (%):**

vypočítaná C, 64.71; H, 9.41; N, 20.12

nalezená C, 64.82; H, 9.37; N, 19.77

**log*P*:**

2,64

**IR spektrum (ATR-Ge,  $cm^{-1}$ ):**

3270 (-NH-), 2926 (-CH<sub>2</sub>-), 1693 (-C=O), 1600, 1552, 1504 (arom.)

**<sup>1</sup>H NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 10.08 (s, 1H, urea), 8.91 (s, 1H, urea), 8.91 (d, *J*=2.9 Hz, 1H, pyrazin), 8.91 (d, *J*=2.9 Hz, 1H, pyrazin), 8.09–8.04 (m, 1H, pyrazin), 3.44–3.36 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.36–1.21 (m, 16H, -C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>-), 0.88 (t, *J*=6.9 Hz, 3H, -CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR:**

(CDCl<sub>3</sub>) δ 156.1, 150, 139.3, 136.4, 136.2, 40, 31.9, 29.9, 29.6, 29.5, 29.3, 27, 22.6, 14.1

## 6.4 Výsledky biologického hodnocení *in vitro*

### 6.4.1 Antimykobakteriální aktivita

Všechny nasyntetizované látky byly testovány *in vitro* na kmenech *M. tuberculosis* H37Rv CNCTC My 331/88 (ATCC 27294), *M. kansasii* Hauduroy CNCTC My 235/80 (ATCC 12478) a *M. avium* ssp. *avium* Chester CNCTC My 80/72 (ATCC 15769). Tyto kmeny byly získány z České národní sbírky typových kultur (CNCTC), Praha, Česká republika. Testování probíhalo ve Fakultní nemocnici Hradec Králové v Ústavu klinické mikrobiologie pod vedením MUDr. Paterové.

Kultivačním médiem byl Middlebrook 7H9 (získán od firmy Sigma-Aldrich) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich) a 10 % růstového doplňku OADC (kyselina olejová, albumin, dextrosa, katalasa), který byl zakoupen od firmy HiMedia, Mumbaj, Indie. Růstové médium mělo deklarované pH 6,6.

Testování probíhalo mikrodiluční metodou. Zkoušené sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich), smíchány s médiem a nanесeny na testovací plotny. Kmeny mykobakterií byly suspendovány ve fyziologickém roztoku a poté použity na naočkování ploten. Výsledné koncentrace testovaných látek byly 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 a 1,56 µg/ml. Jako pozitivní kontrola sloužil pyrazinamid a isoniazid, pro negativní kontrolu pak směs kultivačního média a DMSO.

Testovací destičky byly umístěny v tmavém vlhkém prostředí při teplotě 37 °C. Po pěti dnech byl na plotny přidán roztok Alamar Blue (tedy 0,1% roztok resazurinu a 10% Tween 80 v poměru 1:1) a po 24 hodinách byl odečten výsledek. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla určena jako nejnižší koncentrace, při které nedošlo k barevné změně indikátoru z modré na růžovou. Výsledky hodnocení jsou uvedeny v Tab. 3.

**Tab. 3:** Antimykobakteriální aktivita (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*) vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace

|                    | MIC (µg/ml)            |                    |                 |
|--------------------|------------------------|--------------------|-----------------|
|                    | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. kansasii</i> | <i>M. avium</i> |
| <b>propyl</b>      | >100                   | >100               | >100            |
| <b>butyl</b>       | >100                   | >100               | >100            |
| <b>pentyl</b>      | 100                    | >100               | >100            |
| <b>oktyl</b>       | 25                     | 25                 | >100            |
| <b>decyl</b>       | >100                   | >100               | >100            |
| <b>pyrazinamid</b> | >100                   | >100               | >100            |
| <b>isoniazid</b>   | 0,2–0,4                | 6,25–12,5          | 6,25–12,5       |

Dále byly látky testovány na kmenech mykobakterií *M. smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) a *M. aurum* DSM 43999 (ATCC 23366), které byly získány z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (Braunschweig, Německo). Testování prováděl PharmDr. Ondřej Jand'ourek, PhD. na Katedře biologických a lékařských věd FaF UK.

Růstovým médiem byl Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich) obohacený o 0,4 % glycerolu (Sigma-Aldrich) a 10 % růstového doplňku OADC (kyselina olejová, albumin, dextrosa, katalasa), který byl zakoupen od firmy HiMedia, Mumbaj, Indie.

I tato aktivita byla stanovena pomocí mikrodiluční metody. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich) a bylo přidáno médium pro získání koncentrace látek 2000 µg/ml. Dvojkovým ředěním se poté získaly konečné koncentrace testovaných sloučenin 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,81 a 3,91 µg/ml. Jako standardy byly použity isoniazid, rifampicin a ciprofloxacin (vše Sigma-Aldrich); isoniazid o stejných koncentracích jako testované látky, rifampicin v koncentracích 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 a 0,098 µg/ml a ciprofloxacin v koncentracích 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0313, 0,0156 a 0,0078 µg/ml.

Testovací destičky byly překryty polyesterovou fólií a ponechány k inkubaci ve tmě při 37 °C. Jako indikační roztok byl použit 0,02% roztok resazurinu a 10% Tween 80 v poměru 1:1. K plotnám naočkovaným *M. smegmatis* byl po 48 hodinách inkubace přidán indikátor a plotny se nechaly inkubovat další dvě a půl hodiny. K plotnám s *M. aurum* byl indikátor přidán po 72 hodinách a poté inkubace pokračovala

ještě čtyři hodiny. MIC byla určena jako nejnižší koncentrace, při které nedošlo k barevné změně indikátoru z modré na růžovou. Výsledky hodnocení jsou uvedeny v Tab. 4.

**Tab. 4:** Antimykobakteriální aktivita (*M. smegmatis*, *M. aurum*) vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace

|                      | MIC (µg/ml)         |                 |
|----------------------|---------------------|-----------------|
|                      | <i>M. smegmatis</i> | <i>M. aurum</i> |
| <b>propyl</b>        | ≥500                | ≥500            |
| <b>butyl</b>         | ≥500                | 250             |
| <b>pentyl</b>        | ≥500                | 125             |
| <b>oktyl</b>         | ≥500                | ≥500            |
| <b>decyl</b>         | ≥250                | ≥250            |
| <b>isoniazid</b>     | 7,81–15,63          | 1,95–3,91       |
| <b>rifampicin</b>    | 12,5–25             | 0,78–1,56       |
| <b>ciprofloxacin</b> | 0,06–0,13           | 0,008–0,016     |

#### 6.4.2 Antibakteriální aktivita

Pro testování antibakteriální aktivity bylo použito pět kmenů získaných z České sbírky mikroorganismů (CCM, Brno, Česká republika) a tři kmeny z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Kmeny získané z CCM byly *Staphylococcus aureus* CCM 4223 (ATCC 29213), methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* CCM 4750 (ATCC 43300), *Enterococcus faecalis* CCM 4224 (ATCC 29212), *Escherichia coli* CCM 3954 (ATCC 25922) a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (ATCC 27853), z Ústavu klinické mikrobiologie pocházely kmeny *Staphylococcus epidermidis* 112-2016, *Klebsiella pneumoniae* 64-2016 a *Serratia marcescens* 62-2016. Testování prováděl PharmDr. Ondřej Jand'ourek, PhD. na Katedře biologických a lékařských věd FaF UK.

Pro stanovení antibakteriální aktivity byla použita mikrodiluční bujonová metoda. Jako růstové médium byl použit Mueller-Hintonův bujon (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) o pH 7,0. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO, jako kontrolní vzorek bylo použito médium s DMSO a jako standard gentamicin a ciprofloxacin. Výsledná MIC byla odečtena po 24 a 48 hodinách inkubace

(u *Pseudomonas aeruginosa* po 72 a 120 hodinách) při 35 °C pomocí roztoku Alamar Blue. Výsledky hodnocení jsou uvedeny v Tab. 5.

**Tab. 5:** Antibakteriální aktivita vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace

|   | čas     | MIC (µg/ml) |       |        |       |       |
|---|---------|-------------|-------|--------|-------|-------|
|   |         | propyl      | butyl | pentyl | oktyl | decyl |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                        | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i>                   | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                        | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Escherichia coli</i>                             | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                        | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Serratia marcescens</i>                          | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                       | 72 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|   | 120 hod | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |

#### 6.4.3 Antimykotická aktivita

Antimykotická aktivita byla testována na sedmi kmenech pocházejících z CCM, a to *Candida albicans* CCM 8320 (ATCC 24433), *C. krusei* CCM 8271 (ATCC 6258), *C. parapsilosis* CCM 8260 (ATCC 22019), *C. tropicalis* CCM 8264 (ATCC 750), *Aspergillus flavus* CCM 8363, *Absidia/Lichtheimia corymbifera* CCM 8077 a *Trichophyton interdigitale* CCM 8377 (ATCC 9533), a jednomu kmeni pocházejícím z American Type Collection Cultures (ATCC, Manassas, VA, USA) – *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305. Testování bylo prováděno na Katedře biologických a lékařských věd FaF UK PharmDr. Ondřejem Jand'ourkem, PhD.

Antimykotická aktivita byla stanovena použitím mikrodiluční bujonové metody. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO a naředěny dvojkovou ředící řadou. Ke kultivaci bylo použito médium RPMI 1640 s glutaminem a 2% glukosou a se stanoveným pH 7,0. Inkubace probíhala v tmavém a vlhkém prostředí při teplotě 35 °C. Jako standard sloužil amfotericin B a flukonazol. MIC se odečítala po 24 a 48 hodinách pro všechny kmeny kromě *Trichophyton interdigitale*, kde se výsledky odečítaly až po 72 a 120 hodinách. Výsledná hodnota MIC byla stanovena vizuálním vyhodnocením pomocí Alamar Blue. Výsledky hodnocení jsou uvedeny v Tab. 6.

**Tab. 6:** Antimykotická aktivita vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace

|                                       | čas     | MIC (µg/ml) |       |        |       |       |
|---------------------------------------|---------|-------------|-------|--------|-------|-------|
|                                       |         | propyl      | butyl | pentyl | oktyl | decyl |
| <i>C. albicans</i>                    | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>C. krusei</i>                      | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>C. parapsilosis</i>                | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>C. tropicalis</i>                  | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>          | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Aspergillus flavus</i>             | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Absidia/Lichthemia corymbifera</i> | 24 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 48 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
| <i>Trichophyton interdigitale</i>     | 72 hod  | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |
|                                       | 120 hod | >500        | >500  | >500   | >500  | >250  |



## 7. Diskuze

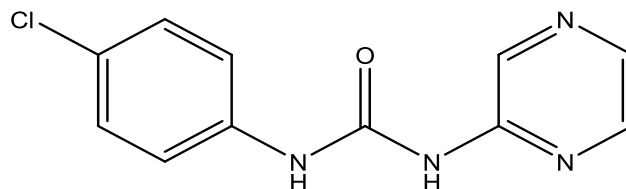
V rámci experimentální části mé diplomové práce bylo připraveno celkem pět derivátů aminopyrazinu reakcí s isokyanáty s různě dlouhými alkylovými řetězci. Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru po dobu jedné hodiny a získané látky byly poté přečištěny pomocí flash chromatografie. Výsledné produkty byly krystalické látky bílé až žluté barvy a byly charakterizovány pomocí teplot tání, elementární analýzy, IR spekter a NMR spekter pro potvrzení jejich struktury.

Výtěžky získaných látek se pohybovaly v rozmezí 24–51 %. Tyto poměrně vysoké ztráty byly nejspíše zapříčiněny čistícími metodami, tedy při adsorpci na silikagel a následné flash chromatografii.

Teoretické hodnoty lipofility  $\log P$ , které byly vypočítány pomocí programu CS ChemBioDraw Ultra, se pohybovaly v rozmezí -0,28–2,64. Vysoká lipofilita látek je potřeba pro přestup přes nepolární buněčnou stěnu mykobakterií.

V rámci této série nově syntetizovaných derivátů pyrazinu byly připraveny také arylové deriváty. [47] Jejich biologickou aktivitu *in vitro* zde uvedu pro srovnání s mnou připravenými alkylovými deriváty.

Při testování antimykobakteriální aktivity se u žádné látky neprokázala aktivita kromě derivátu s oktylovým řetězcem. Ten vykazoval mírnou aktivitu proti *M. tuberculosis* a *M. kansasii* (viz Tab. 3 a Tab. 4), v obou případech byla jeho MIC 25  $\mu\text{g/ml}$ . Ve skupině arylových derivátů také nebyla prokázána antimykobakteriální aktivita u žádné látky kromě jedné. Její aktivita proti *M. tuberculosis* byla vyšší než u výše zmíněného alkylového derivátu (viz Tab. 7 a Tab. 8). Žádná z testovaných látek neměla antibakteriální a antimykotickou aktivitu.



*N*-(4-chlorfenyl)-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina

**Tab. 7:** Antimykobakteriální aktivita (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*) arylových derivátů vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace. Převzato z *Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors*. [47]

|                         | MIC (µg/ml)            |                    |                 |
|-------------------------|------------------------|--------------------|-----------------|
|                         | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. kansasii</i> | <i>M. avium</i> |
| <b>benzyl</b>           | >100                   | >100               | >100            |
| <b>4-methoxyfenyl</b>   | >100                   | >100               | >100            |
| <b>2-chlorfenyl</b>     | >100                   | >100               | >100            |
| <b>4-chlorfenyl</b>     | 12,5                   | >100               | >100            |
| <b>3,4-dichlorfenyl</b> | >100                   | >100               | >100            |
| <b>2-chlorbenzyl</b>    | >100                   | >100               | >100            |
| <b>pyrazinamid</b>      | >100                   | >100               | >100            |
| <b>isoniazid</b>        | 0,2–0,4                | 6,25–12,5          | 6,25–12,5       |

**Tab. 8:** Antimykobakteriální aktivita (*M. smegmatis*, *M. aurum*) arylových derivátů vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace. Převzato z *Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors*. [47]

|                         | MIC (µg/ml)         |                 |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
|                         | <i>M. smegmatis</i> | <i>M. aurum</i> |
| <b>benzyl</b>           | ≥500                | ≥500            |
| <b>4-methoxyfenyl</b>   | ≥500                | ≥500            |
| <b>2-chlorfenyl</b>     | ≥125                | ≥125            |
| <b>4-chlorfenyl</b>     | ≥500                | ≥500            |
| <b>3,4-dichlorfenyl</b> | ≥250                | ≥250            |
| <b>2-chlorbenzyl</b>    | ≥125                | ≥125            |
| <b>isoniazid</b>        | 7,81–15,63          | 1,95–3,91       |
| <b>rifampicin</b>       | 12,5–25             | 0,78–1,56       |
| <b>ciprofloxacin</b>    | 0,06–0,13           | 0,008–0,016     |

## 8. Závěr

V rámci mé diplomové práce bylo cílem provést rešerši týkající se tuberkulózy a jejích klinických projevů, současné terapie TBC a aktuálního výzkumu nových antituberkulotik. Tyto informace jsem vyhledala s využitím tištěných i elektronických zdrojů a získané informace jsem uvedla v teoretické části.

Druhým cílem mé diplomové práce byla syntéza nových derivátů pyrazinu v souvislosti s aktuálním výzkumem na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Připravila jsem celkem pět látek:

- *N*-propyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina
- *N*-butyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina
- *N*-pentyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina
- *N*-oktyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina
- *N*-decyl-*N'*-(pyrazin-2-yl)močovina

Všechny tyto látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, elementární analýzy, IR spekter a NMR spekter a poté odeslány na hodnocení jejich biologické aktivity.

Žádná z připravených látek nevykazovala antibakteriální a antimykotickou aktivitu. Při testování na antimykobakteriální aktivitu prokázal jeden derivát aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium kansasii*.

## 9. Seznam citované literatury

1. SEMELKOVÁ, L.; JANOŠCOVÁ, P.; FERNANDES, C.; et al. Design, Synthesis, Antimycobacterial Evaluation, and In Silico Studies of 3-(Phenylcarbamoyl)-pyrazine-2-carboxylic Acids. *Molecules*. 2017, **22**(9), 1491-. DOI: 10.3390/molecules22091491. ISSN 1420-3049.
2. SEMELKOVÁ, L.; JANĎOUREK, O.; KONEČNÁ, K.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L. 3-Substituted N-Benzylpyrazine-2-carboxamide Derivatives: Synthesis, Antimycobacterial and Antibacterial Evaluation. *Molecules*. 2017, **22**(3). DOI: 10.3390/molecules22030495. ISSN 1420-3049.
3. JANDOUREK, O.; TAUCHMAN, M.; PATEROVA, P.; KONECNA, K.; NAVRATILOVA, L. Synthesis of Novel Pyrazinamide Derivatives Based on 3-Chloropyrazine-2-carboxamide and Their Antimicrobial Evaluation. *Molecules*. 2017, **22**(2). DOI: 10.3390/molecules22020223. ISSN 1420-3049.
4. ZITKO, J.; SERVUSOVÁ-VAŇÁSKOVÁ, B.; PATEROVÁ, P.; NAVRÁTILOVÁ, L.; TREJTNAR, F.; KUNEŠ, J.; DOLEŽAL, M. Design, synthesis and anti-mycobacterial evaluation of some new N-phenylpyrazine-2-carboxamides. *Chem. Pap.* 2015. DOI: 10.1515/chempap-2015-0246. ISSN 1336-9075.
5. SEMELKOVA, L.; KONECNA, K.; PATEROVA, P.; KUBICEK, V.; KUNES, J.; NOVAKOVA, L.; MAREK, J.; NAESSENS, L. Synthesis and Biological Evaluation of N-Alkyl-3-(alkylamino)-pyrazine-2-carboxamides. *Molecules*. 2015, **20**(5). DOI: 10.3390/molecules20058687. ISSN 1420-3049.
6. MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ J.; DVOŘÁČKOVÁ J. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
7. *Global tuberculosis report*. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 2017. ISBN 978-92-4-156551-6.

8. *Základní přehled epidemiologické situace ve výskytu tuberkulózy v ČR v roce 2016*. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online]. 2017 [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/publikace/zakladni-prehled-epidemiologicke-situace-ve-vyskytu-tuberkulozy-v-cr-v-roce-2016>
9. Registr tuberkulózy (RTBC). Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR [online], 2018 [cit. 2018-02-25]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/registry/organu-ochrany-verejneho-zdravi/registr-tuberkulozy>
10. *Tuberkulóza a respirační nemoci*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2014. ISBN 1210-8685.
11. KAŠÁK, V.; KOBLÍŽEK, V. *Naléhavé stavy v pneumologii*. Praha: Maxdorf, c2008. Jessenius. ISBN 978-807-3451-585.
12. [EDITED BY] SOUTHWICK, F. S. *Infectious diseases in 30 days*. New York: McGraw-Hill, 2003. ISBN 00-713-7518-X.
13. ČEŠKA, R.; TESAŘ, V.; DÍTĚ, P.; ŠTULC, T. ed. *Interna*. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-807-3874-230.
14. ED. BY KUMAR, P.; CLARK, M. *Clinical medicine*. 5TH ED. United States: HARCOURT INC TRADE SALES (FL), 2002. ISBN 07-020-2579-8.
15. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
16. Vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem
17. Vyhláška č. 299/2010 Sb., kterou se mění vyhláška č. 537/2006 Sb., o očkování proti infekčním nemocem
18. HARTL, J. *Farmaceutická chemie IV. 2.*, nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-802-4621-296.
19. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
20. STEHR, M.; ELAMIN, A. A.; SINGH, M. Pyrazinamide: the importance of uncovering the mechanisms of action in mycobacteria. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2015, **13**(5), 593-603. DOI: 10.1586/14787210.2015.1021784. ISSN 1478-7210.
21. About Us. *Stop TB Partnership* [online]. Geneva, Switzerland: UNOPS, 2018 [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: <http://www.stoptb.org/about/>

22. Pipeline. *Working Group on New TB Drugs* [online]. New York, 2016 [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: <http://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical>
23. OLARU, I. D.; VON GROOTE-BIDLINGMAIER, F.; HEYCKENDORF, J.; YEW, W. W.; LANGE, Ch.; CHANG, K. Ch. Novel drugs against tuberculosis: a clinician's perspective. *Eur. Respir. J.* 2015, **45**(4), 1119-1131. DOI: 10.1183/09031936.00162314. ISSN 0903-1936.
24. TONG, A. S. T.; CHOI, P. J.; BLASER, A.; et al. 6-Cyano Analogues of Bedaquiline as Less Lipophilic and Potentially Safer Diarylquinolines for Tuberculosis. *ACS Med. Chem. Lett.* 2017, **8**(10). DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00196. ISSN 1948-5875.
25. CHOI, P. J.; SUTHERLAND, H. S.; TONG, A. S. T.; et al. Synthesis and evaluation of analogues of the tuberculosis drug bedaquiline containing heterocyclic B-ring units. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, **27**(23). DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.042. ISSN 0960894X.
26. European Medicines Agency recommends two new treatment options for tuberculosis. *European Medicines Agency* [online]. London, 22/11/2013 [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news\\_and\\_events/news/2013/11/news\\_detail\\_001972.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2013/11/news_detail_001972.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1)
27. DOOLEY, K. E.; NUERMBERGER, E. L.; DIACON, A. H. Pipeline of drugs for related diseases. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2013, **8**(6), 579-585. DOI: 10.1097/COH.0000000000000009. ISSN 1746-630X.
28. Safety and Efficacy of Various Doses and Treatment Durations of Linezolid Plus Bedaquiline and Pretomanid in Participants With Pulmonary TB, XDR-TB, Pre- XDR-TB or Non-responsive/Intolerant MDR-TB (ZeNix). *ClinicalTrials.gov* [online]. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03086486>
29. KWON, Y.-S.; JEONG, B.-H.; KOH, W.-J. Tuberculosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2014, **20**(3), 280-286. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000045. ISSN 1070-5287.
30. SRIVASTAVA, S.; MAGOMBEDZE, G.; KOEUTH, T.; et al. Linezolid Dose That Maximizes Sterilizing Effect While Minimizing Toxicity and Resistance Emergence for Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, **61**(8), e00751-17-. DOI: 10.1128/AAC.00751-17. ISSN 0066-4804.

31. PUCCI, M. J.; BUSH, K. Investigational Antimicrobial Agents of 2013. *Clin. Microbiol. Rev.*. 2013, **26**(4), 792-821. DOI: 10.1128/CMR.00033-13. ISSN 0893-8512.
32. WALLIS, R. S.; DAWSON, R.; FRIEDRICH, S. O.; et al. Mycobactericidal Activity of Sutezolid (PNU-100480) in Sputum (EBA) and Blood (WBA) of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE*. 2014, **9**(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0094462. ISSN 1932-6203.
33. BOEREE, M. J.; HEINRICH, N.; AARNOUTSE, R.; et al. High-dose rifampicin, moxifloxacin, and SQ109 for treating tuberculosis: a multi-arm, multi-stage randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2017, **17**(1). DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30274-2. ISSN 1473-3099.
34. LI, S.-Y.; TASNEEN, R.; TYAGI, S.; SONI, H.; CONVERSE, P. J.; MDLULI, K.; NUERMBERGER, E. L. Bactericidal and Sterilizing Activity of a Novel Regimen with Bedaquiline, Pretomanid, Moxifloxacin, and Pyrazinamide in a Murine Model of Tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, **61**(9), e00913-17-. DOI: 10.1128/AAC.00913-17. ISSN 0066-4804.
35. AHMAD, Z.; TYAGI, S.; MINKOWSKI, A.; PELOQUIN, Ch. A.; GROSSET, J. H.; NUERMBERGER, E. L. Contribution of Moxifloxacin or Levofloxacin in Second-Line Regimens with or without Continuation of Pyrazinamide in Murine Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013, **188**(1), 97-102. DOI: 10.1164/rccm.201212-2328OC. ISSN 1073-449X.
36. RUAN, Q.; LIU, Q.; SUN, F.; et al. Moxifloxacin and gatifloxacin for initial therapy of tuberculosis: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Emerging Microbes Infect.* 2016, **5**(2), e12-e12. DOI: 10.1038/emi.2016.12. ISSN 2222-1751.
37. BOGATCHEVA, E.; HANRAHAN, C.; NIKONENKO, B.; et al. Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, **21**(18), 5353-5357. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.07.015. ISSN 0960894X.
38. MCGUFFIN, S. A.; POTTINGER, P. S.; HARNISCH, J. P. Clofazimine in Nontuberculous Mycobacterial Infections: A Growing Niche. *Open Forum Infect. Dis.* 2017, **4**(3), 1-7. DOI: 10.1093/ofid/ofx147. ISSN 2328-8957.

39. LU, Y.; ZHENG, M.; WANG, B.; et al. Clofazimine Analogs with Efficacy against Experimental Tuberculosis and Reduced Potential for Accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**(11). DOI: 10.1128/AAC.00699-11. ISSN 0066-4804.
40. MAKAROV, V.; LECHARTIER, B.; ZHANG, M.; NERES, J.; VAN DER SAR A. M.; RAADSEN, S. A.; HARTKOORN, R. C.; RYABOVA, O. B. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. *EMBO Mol. Med.* 2014, **6**(3). DOI: 10.1002/emmm.201303575. ISSN 1757-4676.
41. LECHARTIER, B.; COLE, S. T. Mode of Action of Clofazimine and Combination Therapy with Benzothiazinones against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015, **59**(8), 4457-4463. DOI: 10.1128/AAC.00395-15. ISSN 0066-4804.
42. JEONG, J.-W.; JUNG, S.-J.; LEE, H.-H.; et al. In Vitro and In Vivo Activities of LCB01-0371, a New Oxazolidinone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, **54**(12). DOI: 10.1128/AAC.00723-10. ISSN 0066-4804.
43. CHOI, Y.; LEE, S. W.; KIM, A.; et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of 21 day multiple oral administration of a new oxazolidinone antibiotic, LCB01-0371, in healthy male subjects. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018, **73**(1), 183-190. DOI: 10.1093/jac/dkx367. ISSN 0305-7453.
44. ALSAAD, N.; WILFFERT, B.; VAN ALTENA, R.; DE LANGE, W. C. M.; VAN DER WERF, T. S.; KOSTERINK, J. G. W.; ALFFENAAR, J.-W. C. Potential antimicrobial agents for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2014, **43**(3), 884-897. DOI: 10.1183/09031936.00113713. ISSN 0903-1936.
45. SIKKA, P.; et al. Role of Aryl Urea Containing Compounds in Medicinal Chemistry. *Med. Chem.* 2015, **5**(11). DOI: 10.4172/2161-0444.1000305. ISSN 21610444.
46. STAVESKI, M. M.; MILLER, R.; NAHILL, S. R. (Genzyme Corporation): *Urea derivatives and their use as anti-inflammatory agents*. PCT Int. Appl. WO2004063181.



47. BOUZ, G.; JUHÁS, M.; NIKLOVÁ, P.; JANĎOUREK, O.; PATEROVÁ, P.; JANOUŠEK, J.; TŮMOVÁ, L.; KOVALÍKOVÁ, Z.; KASTNER, P.; DOLEŽAL, M.; ZITKO, J. Ureidopyrazine Derivatives: Synthesis and Biological Evaluation as Anti-Infectives and Abiotic Elicitors. *Molecules*. 2017, **22**(10), 1797. DOI: 10.3390/molecules22101797. ISSN 1420-3049.

## 10. Seznam tabulek

|   |    |
|---|----|
| <b>Tab. 1:</b> <i>Přehled látek v současném výzkumu</i> .....   | 21 |
| <b>Tab. 2:</b> <i>Přehled léčiv s antimykobakteriální aktivitou</i> .....   | 28 |
| <b>Tab. 3:</b> <i>Antimykobakteriální aktivita (M. tuberculosis, M. kansasii, M. avium) vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> .....                    | 37 |
| <b>Tab. 4:</b> <i>Antimykobakteriální aktivita (M. smegmatis, M. aurum) vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> .....                                    | 38 |
| <b>Tab. 5:</b> <i>Antibakteriální aktivita vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> ...   | 39 |
| <b>Tab. 6:</b> <i>Antimykotická aktivita vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> .....   | 40 |
| <b>Tab. 7:</b> <i>Antimykobakteriální aktivita (M. tuberculosis, M. kansasii, M. avium) arylových derivátů vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> ..... | 42 |
| <b>Tab. 8:</b> <i>Antimykobakteriální aktivita (M. smegmatis, M. aurum) arylových derivátů vyjádřena pomocí minimální inhibiční koncentrace</i> .....                 | 42 |