

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
katedra farmaceutickej chémie a kontroly liečiv

Deriváty pyrazínu ako potencionálne liečiva IV.
(diplomová práca)

Vedúci diplomovej práce: Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové, 2007

Oliver Schürger

Ďakujem doc. PharmDr. Martinovi Doležalovi,
Ph.D. a Mgr. Lukášovi Palkovi za odborné
vedenie, ochotu a všestrannú pomoc pri
vytvorení tejto diplomovej práce.

OBSAH

1. ÚVODNÁ ČASŤ	4
1.1 TUBERKULÓZA	4
1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	7
1.3 PREVENČIA A LIEČBA TUBERKULÓZY	9
1.4 ZÁKLADNÉ CHARAKTERISTIKY ANTITUBERKULOTICKÝCH LIEČIV	12
1.4.1 Úloha pyrazínamidu v terapii tuberkulózy.....	16
1.4.2 Lieková rezistencia.....	18
1.5 STRATÉGIA VÝVOJA NOVÝCH ANTITUBERKULOTÍK	19
1.6 DOTS	20
1.7 ZHRNUTIE.....	21
1.8 CIEĽ PRÁCE	22
2. TEORETICKÁ ČASŤ.....	23
2.1 VLASTNOSTI PYRAZÍNOVÉHO JADRA	23
2.2 PRÍPRAVA HALOGÉNDERIVÁTOV	25
2.3 PRÍPRAVA AMIDOV	26
2.4 PRÍPRAVA NITRILOV	28
2.5 SUBSTITUČNÉ REAKCIE CHLÓRDERIVÁTOV PYRAZÍNU.....	29
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	32
3.1 SCHÉMA PREVEDENÝCH REAKCIÍ	33
3.2 PRÍPRAVA 4-N-OXIDU PYRAZÍN-2-KARBOXAMIDU	34
3.3 PRÍPRAVA 6-CHLOR-PYRAZÍN-2-KARBONITRILU.....	35
3.4 PRÍPRAVA 3-CHLÓR-5-KYANPYRAZÍN-2-KARBOXAMIDU	36
3.5 PRÍPRAVA 3-CHLÓR-PYRAZÍN-2,5-DIKARBONITRILU	37
3.6 VŠEOBECNÝ POSTUP PRÍPRAVY N-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTOV 3-AMINO-5-KYANPYRAZÍN-2-KARBOXAMIDOV A 3-AMINO-PYRAZÍN-2,5-DIKARBONITRILOV	38
3.6.1 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitrilu.....	39
3.6.2 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitrilu.....	40
3.6.3 Príprava 3-(3-iódo-4-methylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitrilu.....	41
3.6.4 Príprava 3-(4-N,N-dimethylamino-fenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu.....	42
3.6.5 Príprava 3-(4-brómfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu.....	43
3.6.6 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu	44
3.6.7 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu	45
3.6.8 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazín-2-karboxamidu.....	46
3.6.9 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazín-2-karboxamidu.....	47
3.6.10 Príprava 3-(2-thiazolo)-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu	48
4. DISKUSIA	49
5. ZÁVER	50
6. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	51

1. ÚVODNÁ ČASŤ

1.1 TUBERKULÓZA

Tuberkulóza (TBC) je chronické infekčné ochorenie, ktoré postihuje hlavne respiračný systém (80 % – 85 %), ale môže napádať aj iné orgány, ktoré sú zásobované krvou alebo lymfatickými cestami. Radí sa medzi atypické zápalové procesy. Názov ochorenia je odvodený od latinského slova *tuberculum* (uzlíček), pretože u pacientov nakazených tuberkulózou dochádza v mieste pohltenia mykobakteria makrofágom k vytvoreniu granulomatózneho ložiska, tuberkula. Z lokalizácie makrofágov v organizme môžeme usúdiť že granulómy sa budú tvoriť okrem pľúc hlavne v mozgových blanách, pečeni, slezine, obličkách, lymfatických uzlinách a v kostnej dreni.^{1,2}

Najčastejším pôvodcom tuberkulózy je *Mycobacterium tuberculosis*. U hovädzieho dobytku bol objavený kmeň *Mycobacterium bovis*, ktorého oslabená forma sa používa dodnes ako očkovacia látka proti tuberkulóze. V Afrike sa vyskytuje ešte jeden kmeň s podobnými vlastnosťami a to *Mycobacterium africanum*. Asi 10 % ochorení je tvorených atypickými kmeňmi mykobaktérií, ktoré sa celosvetovo označujú ako MOTT (mycobacteria other than tuberculosis). Napr. *Mycobacterium kansasii* alebo *Mycobacterium xenopi*. Tieto mykobaktérie nie sú nebezpečné pre zdravú populáciu, ale pre ľudí so zníženou imunitou (napr. AIDS).³

Mykobaktérie sa odlišujú od ostatných mikroorganizmov predovšetkým stavbou bunkovej steny a odlišnou látkovou výmenou. Bunková stena obsahuje vysoké percento látok charakteru lipidov, okolo 40 - 60%, čo im zaručuje vysokú stabilitu. Ďalšou charakteristikou je dlhá generačná doba (asi 48 hodín).⁴

Človek sa môže nakaziť tuberkulózou inhaláciou kvapôčok s priemerom menším ako 10 mikrometrov, ktoré vznikajú pri kašli infikovanej osoby. Ochorenie vyvolajú mykobaktérie obsiahnuté v týchto kvapôčkach, ktoré pohltnia makrofágy v alveolách. Z jednoduchého prenosu z osoby na osobu vyplýva, že každý neliečený pacient tvorí riziko pre celú populáciu, ale vyliečením

posledného dôjde k eradikácii pôvodcu. K vyvolaniu infekcie stačí len jediný mikroorganizmus. Infikovaná osoba šíri patogény dlho pred tým, než je ochorenie diagnostikované. Obvykle je infikovaných 50 % nechránených osôb a na jedného neliečeného pacienta pripadá priemerne 10 – 15 novo vzniknutých prípadov tuberkulózy ročne. Rizikovou skupinou sú hlavne ľudia so zníženou imunitou. Pre pacientov s AIDS je tuberkulóza najčastejšou príčinou úmrtia. Dôležitú úlohu pri jej vzniku hrajú hygienické pomery a úroveň výživy. V minulosti aj u nás postihovala prevažne sociálne slabších ľudí, ktorí bývali vo vlhkých a tmavých bytoch a trpeli podvýživou. Preto sa o nej hovorilo ako o chorobe z chudoby.²

Diagnostiku TBC stanovuje odborný lekár - pneumológ. Využívajú sa hlavne dve metódy. Dnes sa diagnostika opiera hlavne o bakteriologický dôkaz kultiváciou sputa. Nepostrádateľné je tiež röntgenové vyšetrenie hrudníku, poprípade ďalších postihnutých orgánov. To odhalí fibrotizované a kalcifikované ložiská. Mezi pomocné diagnostické metódy patrí tuberkulínový test (PPD test - protein purified derivative of tuberculin). Tuberkulín se vstrekuje do kože a následné posúdenie reakcie umožní zistiť, či sa pacient stretol s TBC (včetně očkovania). Nevýhodou tohoto testu je hlavne v Európe skreslené stanovenie prípadnej diagnózy vysokým percentom očkovaných ľudí.⁵

Tuberkulóza sa prejavuje zväčša nebadane zvýšenou únavou, nechúťou do jedenia, chudnutím a mierne zvýšenou teplotou, ktorá vrcholí okolo 17. hodiny. V tomto štádiu je príznačné nočné potenie. Kašeľ je spočiatku suchý, neskôr chorý vykašľáva hlienovo hnisový obsah, niekedy s prímесou krvi. V pľúcach medzitým dochádza k tvorbe tuberkulózných uzlíkov obsahujúcich samotné mykobaktérie, aktivované mikrofégy, lymfocyty fibroblasty ako následok imunitnej odpovedi organizmu na infekciu. Vzniknutý tuberkulus môže uchovávať baktérie po neobmedzene dlhú dobu, pretože mykobaktérie majú schopnosť zpomalit' metabolismus na minimum a perzistovať v tzv. spiacej forme po veľmi dlhú dobu. Potom nastáva fáza kaseinizácie keď začne obsah tuberkulu nekrotizovať čo vyvolá rozpad a uvoľnené životaschopné mikroorganizmy vyvolajú novú infekciu, alebo sa vylieči za súčasnej kalcifikácie a fibrotizácie. Avšak aj v týchto zväpenatených ložiskách môžu patogény pretrvávajúť.⁵

Tuberkulóza dnes

Podľa WHO sa tuberkulózou nakazilo v roku 2005 vo svete 8,8 milióna ľudí a 1,5 milióna ľudí na ňu zomrelo. Odhaduje sa, že tretina svetovej populácie je infikovaná TBC (každú sekundu sa niekto infikuje). Pritom len približne 5 % - 10 % infikovaných jedincov behom svojho života skutočne ochorie. Výskyt TBC je dnes z 3/4 sústredený do rozvojových zemí. V roku 1995 zomrelo na tuberkulózu najviac ľudí v histórii. Odvtedy úmrtnosť klesá. V súčasnosti je situácia stabilizovaná, dokonca incidencia klesla natoľko, že pri súčasnom prístupe k liečbe by sa mohla do roku 2050 úplne eradikovať.

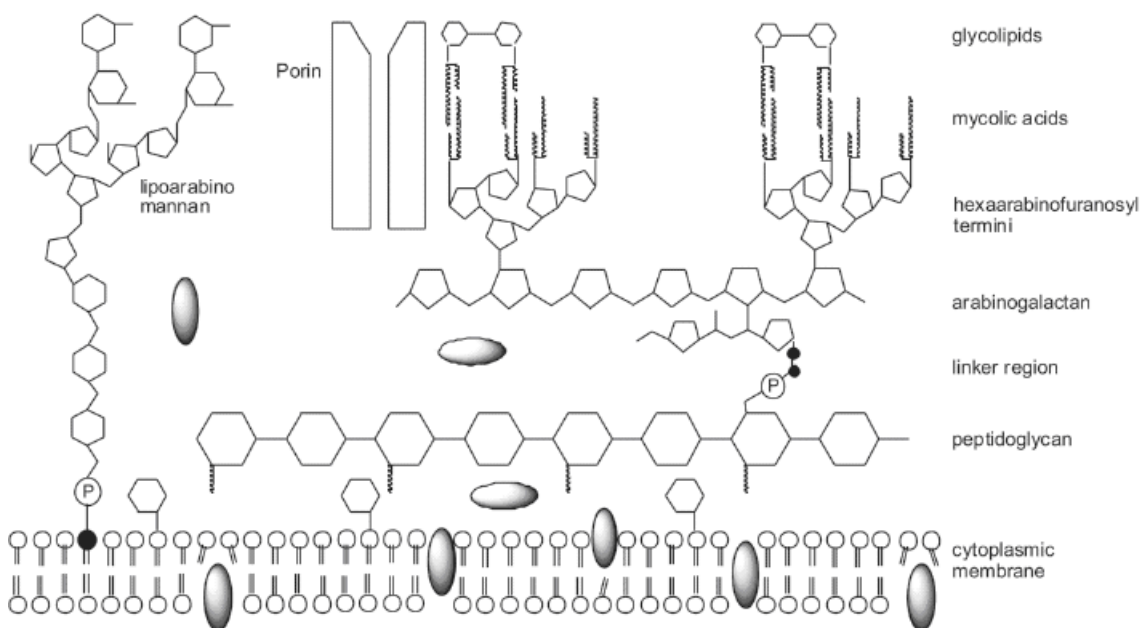
- TBC je najčastejšia príčina smrti na infekčnú chorobu mladých i dospelých
- TBC je hlavnou príčinou úmrtia u ľudí infikovaných HIV a trpiacimi AIDS
- zo všetkých "odvratiteľných" úmrtí dospelých na svete približne 26 % (2.7 miliónov) je na TBC

Od roku 2006 WHO vypracovala program zameraný na liečbu TBC opierajúci sa o DOTS (directly observed treatment shortcourse, bude pojednané v samostatnej kapitole), monitorovanie prípadov TBC a snahou rozšíriť dostupnosť kvalitnej lekárskej starostlivosti pre všetky sociálne vrstvy a podporiť výskum v snahe o objavenie nových a kvalitnejších liekov.⁶

1.2 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

V roku 1882 bol objavený patogén spôsobujúci tuberkulózu, teda *Mycobacterium tuberculosis*. Objaviteľom bol nemecký mikrobiológ a zakladateľ bakteriológie Robert Koch (odtiaľ pochádza pomenovanie Kochov bacil). *Mycobacterium tuberculosis* je obligátnym aeróbom, má tyčkovitý tvar, veľkosť 0,5 - 5 μm a má unikátnu štruktúru bunkovej steny. Generačná doba (čas potrebný na vznik dvoch baktérií z jednej) sa udáva 24 - 48 hodín.

Bunková stena mykobaktérií je extrémne hrubá oproti iným mikroorganizmom, je hydrofóbna a obsahuje vysoké percento lipidov včetně špeciálnych liposacharidov, napríklad lipoarabinomannanu. Jednou z hlavných zložiek bunkovej steny mykobaktérií sú mykolové kyseliny, ktorým sa pripisuje schopnosť odolávať nízkemu pH. Ďalšími dôležitými polymérmi tvoriacimi bunkovú stenu sú arabinogalaktan a peptidoglykan. Štruktúra bunkovej steny je podrobnejšie znázornená a popísaná na obr. 1.



Obr. 1: Štruktúra a zloženie mykobakteriálnej bunkovej steny (upravené podľa⁷)

Až 60 % suchej váhy organizmu môže tvoriť mykolová kyselina, tj. vetvená masťná kyselina s dlhým reťazcom ktorý tvorí 60 až 90 atómov uhlíka. Kratšiu vetvu tvorí 22 až 24 uhlíkov, zatiaľ čo dlhšiu 44 až 60 atómov uhlíka. Je

viazaná s netypickým alkoholom, disacharidom trehalózou. Podľa typu tejto kyseliny môžeme rozlišovať jednotlivé mykobaktérie. Mykolové kyseliny sú esterovou väzbou viazané na terminálnu arabinózu arabinogalaktanu. Arabinogalaktan je tvorený arabinofuranózou a galaktofuranózou, čo je u baktérií netypické, pretože sa u nich častejšie vyskytujú v bunkovej stene 6-uhlíkové sacharidy. Arabinogalaktan je fosfodiesterovou väzbou viazaný na peptidoglykan, ktorý je najbližšie cytoplazmatickej membráne. Arabinogalaktan tvorí N-glykoilmurámová kyselina miesto acetylmurámovej kyseliny, ktorá sa vyskytuje u väčšiny baktérií. Tieto štyri zložky (lipoarabinomannan, mykolové kyseliny, arabinogalaktan, peptidoglykan) sú súčasťou hlavnej kostry bunkovej steny. Bunková stena obsahuje malé percento nekovalentne viazaných mastných kyselín ktoré sa môžu v organizme uvoľniť a vyvolať imunitnú reakciu. Posledná a zásadná výhoda bunkovej steny je rezistencia na oxidatívne procesy, vďaka čomu môže mykobaktéria prežiť aj v makrofágoch.

Vysoký obsah rôznych lipidov v bunkovej stene zabezpečuje širokú variabilitu enzýmov podieľajúcich sa na syntéze mastných kyselín. Z najdôležitejších je to FAS II (prokaryotic-like fatty acid synthetase), ktorá sa vyskytuje u väčšiny baktérií. Mykobaktérie majú na rozdiel od nich aj FAS I (eukaryotic-like fatty acid synthetase), ktorá sa bežne vyskytuje v eukaryotických bunkách. Kombináciou biochemických reakcií katalyzovaných na týchto enzýmoch vznikajú mykolové kyseliny. Práve preto sa inhibícia týchto enzýmov stáva častým terčom účinku antituberkulotík.⁴

Diagnostické stanovenie prítomnosti *Mycobacteria tuberculosis* sa dá uskutočniť mikrobiologickým vyšetrením sputa. Buď orientačne, mikroskopicky pomocou Ziehl-Neelsonovho farbenia, špecifického pre acidorezistentné mikroorganizmy, alebo kultiváciou sputa na pevnom či tekutom médiu. Mykobaktérie musia byť kultivované na špeciálnych, pre ne selektívnych pôdach. Na pevnom médiu možno očakávať dobu kultivácie mesiac a viac. V dnešnej dobe to urýchľuje radiometrická metóda BACTEC, ktorej princíp spočíva v detekcii CO₂ ako produktu metabolizmu so značeným uhlíkom meračom gama žiarenia. Výsledok je známy do 4 – 6 dní. Ďalej sa dajú využiť v klinickej praxi PCR sondy, u ktorých je spodný limit detekcie mykobaktérií nižší než u farbiacich metód.^{2,8}

1.3 PREVENCIA A LIEČBA TUBERKULÓZY

Človek nakazený tuberkulózou má pri dodržiavaní zásad liečby vysokú šancu na vyliečenie. Zásady liečby antituberkulotikmi sú nasledovné:

- pacient musí užívať viac liečiv naraz, v závislosti od citlivosti mikroorganizmu. Dôvodom je vysoký výskyt a rozvoj rezistentných kmeňov
- pacient musí užívať liečivá pravidelne v stanovenú dobu, je stále pod lekárske dozorom a liečivá berie v dostatočných dávkach (dosahujú v mieste účinku dostatočnú koncentráciu pre bakteriostatický až baktericidný efekt)
- liečivá sa podávajú po stanovenú dobu, ktorá je väčšinou aspoň 6 mesiacov dlhá.

Moderná stratégia TBC liečby bola vypracovaná WHO v deväťdesiatych rokoch a je celosvetovo zavádzaná do praxe. Spočíva v štandardizovaných kombináciách štyroch, eventuálne piatich základných liečiv, tzv. Antituberkulotík prvej línie aplikovaných spolu s individuálnou starostlivosťou o každého pacienta (DOTS). Účinný TBC program, ktorým by bol znížený výskyt tuberkulózy, má vyliečiť aspoň 85 % nakazených. Základom liečby zostávajú po roky používané liečivá s baktericidnými a sterilizačnými vlastnosťami (zabíjajú perzistory).⁶

Vysoký dôraz sa kladie aj na prevenciu obyvateľov žijúcich v rizikových oblastiach, kde je výskyt tuberkulózy a teda aj riziko nakazenia vysoké. Rovnako dôležitá je aj prevencia u ľudí s AIDS a u ľudí ktorí majú abnormálny röntgenový snímok hrudníka, alebo pozitívny tuberkulínový test bez predošlého očkovania. Súčasná prevencia vzniku tuberkulózy je:

- Očkovanie BCG vakcínou – tvorí špeciálnu súčasť terapie TBC. Vykonáva sa pomocou BCG vakcíny (bielkovinná kultivácia *M. bovis*). Je to živá oslabená vakcína, a preto je menej bezpečná u imunosuprimovaných pacientov. Potenciálnu populáciu pre očkovanie tvoria neinfikované osoby, najčastejšie deti a mladiství žijúci v rizikových oblastiach, aktívne chorí (u nich sa jedná o imunoterapiu) a tiež osoby s pozitívnym kožným testom nedávno infikované alebo latentne nakazené, ako prevencia choroby. Očkujú sa tiež infikované tehotné ženy s negatívnym kožným testom ako prevencia neonatálnej

meningitídy. V súčasnosti narastajú negatíva spojené s očkovaním. Patria sem falošne pozitívne výsledky tuberkulínového testu a nízka účinnosť očkovacej látky.

- Vyšetrovanie kontaktov, ich následná izolácia, liečba a sledovanie po liečbe.
- Chemoprofylaxia izoniazidom. Cieľom profylaxie je zabrániť vzniku ochorenia za určitých rizikových situácií, najčastejšie spojených s pozitívnou tuberkulínovou skúškou u neočkovaných ľudí alebo u ľudí ktorý boli nedávno v kontakte s infikovanou osobou. Zvláštnu pozornosť si zasluhujú pacienti s AIDS, alebo diabetes, či inou chorobou, ktorá komplikuje liečbu. Isoniazid má radu výhodných vlastností. Je lacný, účinný, má jednoduchú liekovú formu a v kombinácii s ostatnými liekmi dokáže liečiť tuberkulózu. Chemoprofylaxia sa uskutočňuje väčšinou vo forme monoterapie izoniazidom 300 mg denne po dobu 6 - 12 mesiacov. K prevencii periférnej neuritídy sa podáva 10 mg pyridoxínu denne.
- Preventívne opatrenia dopĺňa dodržiavanie hygienických zásad a snaha o včasné odhalenie infekčných jedincov.⁹

V liečbe sa rozlišujú pacienti, ktorý sa s tuberkulózou nikdy nestretli a pacienti ktorý už tuberkulózu prekonali, u ktorých môžeme počítať s liekovou rezistenciou a pre to je treba dôkladnejšie zvoliť správnu liečbu. Väčšinou sa lieky podávajú 6 - 8 mesiacov pre poistenie sterility tuberkulózneho ložiska. Aby bol dosiahnutý požadovaný liečebný účinok, je nutné, aby pacient čo najprísnejšie dodržal správne užívanie doporučených dávok. Inak predlžuje dobu svojej liečby, zvyšuje náklady na liečbu a podporuje vznik rezistentných kmeňov. Monitorovanie priebehu liečby sa deje pravidelne, opakovaným bakteriologickým vyšetrením sputa. Aj po vyliečení sú pacienti sledovaní. Obvykle v liečbe postačí päť liečiv a to:

- izoniazid (INH)
- streptomycín (STM)
- rifampicín (RMP)
- ethambutol (EMB)
- pyrazínamid (PZA)

Do prvej línie terapie sú radené INH, RMP, PZA, poprípade EMB pri terapii štyrmi liekmi. V Českej republike je v terapii štyrmi liekmi tiež miesto

EMB používaný STM. Medzi lieky druhej voľby patria kys. para-amino salicylová, cykloserin a niektoré makrolidy, aminoglykozidy alebo fluorované chinolóny.

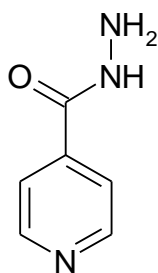
Liečba pľúcnej TBC prebiehá v dvoch fázach. V iniciálnej (intenzívnej) fázi pacienti dostávajú dva mesiace štyri lieky denne (INH, RMP, PZA, EMB/STM).

Cieľom je čo najrýchlejšie a najefektívnejšie zničiť všetky aktívne mykobaktery súčasne dať minimálny priestor pre rozvoj liekovej rezistencie. V pokračujúcej fáze sa podávajú 4 mesiace kombinácia INH a RMP denne alebo 4 mesiace intermitentne táto kombinácia 3x týždenne. Pokiaľ je pacient citlivý na PZA predlžuje sa liečba IZH a RMP na celkových 9 mesiacov.

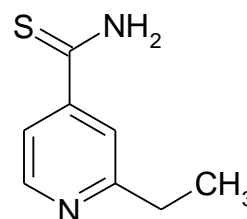
Medzi nové liečivá patria: deriváty rifamycínu (rifapentín, rifabutín), aminoglykozidy (amikacín, kanamycín, kapreomycín), makrolidy (erytromycín, klaritromycín), cefalosporíny (cefoxitín), fluorované chinolóny (ofloxacín, ciprofloxacín, perfloxacín, difloxacín) a popríklad aj antileprotiká (klofazimín, dapson). Ich používanie má opodstatnenie u ochorení, ktoré sú vyvolané polyrezistentnými kmeňmi *M. tuberculosis*, pri infekciách atypickými mykobaktériami a u niektorých menej častých mykobakteriôz. Skôr okrajový význam majú tetracyklíny (doxycyklín), ostatné beta-laktámy (amoxicilín/kyselina klavulánová) a sulfónamidy (sulfametoxazol/trimetoprim).^{2,5}

1.4 Základné charakteristiky antituberkulotických liečiv

Isoniazid (INH) je hydrazidom kyseliny nikotínovej. Prvýkrát syntetizovaný bol v roku 1952. Odvtedy je celosvetovo najpoužívanejším liečivom pre svoju nízku cenu, vysokú biologickú dostupnosť a účinnosť. Pôsobí baktericídne na rýchlo množiacu sa populáciu baktérií a bakteriostaticky na tzv. spiace mykobaktery. Mechanizmom účinku je inhibícia jedného z komponentov enzýmu FAS II - dlhoreťazcovú enoyl-ACP reduktázu vyšších mastných kyselín a tým aj inhibícia syntézy mykolových kyselín. Jeho MIC (minimálna inhibičná koncentrácia) je 0,025-0,2 $\mu\text{g/ml}$. Medzi nežiadúce účinky patrí hepatotoxicita, nauzea, nechutenstvo a periférna neutropénia, čo sa dá zmierniť súčasným podávaním pyridoxínu. Podobné vlastnosti má aj v roku 1956 syntetizovaný **Ethionamid** (ETA - MIC činí 0,3-10 $\mu\text{g/ml}$).



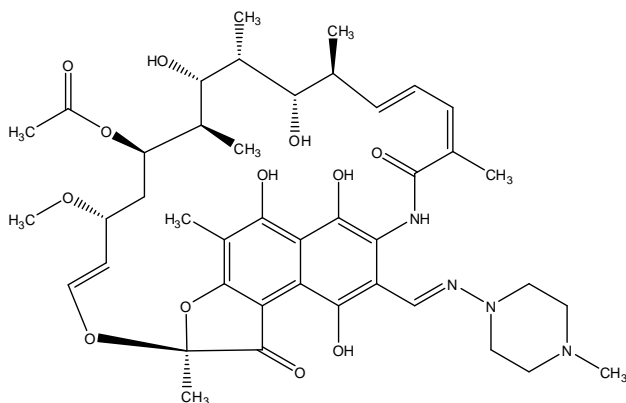
INH



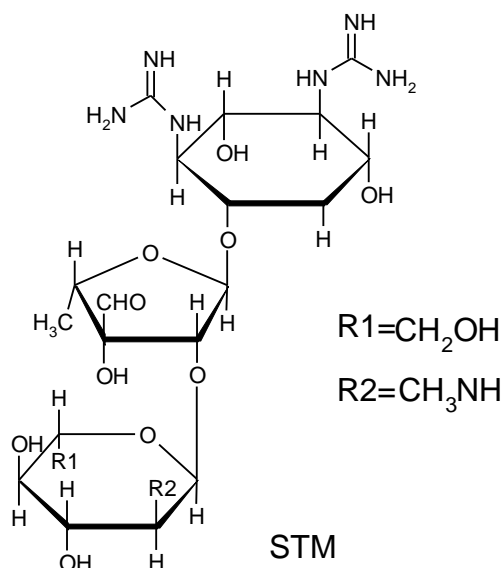
ETA

Významnou skupinou antituberkuloticky účinných látok sú ansamycíny. Majú planárnu aromatickú časť molekuly premostenú dlhým alifatickým reťazcom s laktámovou väzbou. Majú bakteriostatický a sterilizačný efekt. Mechanizmus účinku spočíva v inhibícii proteosyntézy prostredníctvom inaktivácie bakteriálnej DNA-dependentnej RNA polymerázy. Majú veľmi široké antibakteriálne spektrum zahrňujúce vedľa rady grampozitívnych a gramnegatívnych kokov i chlamýdie, mykoplazmy a rickettsie, avšak používajú sa výhradne na liečbu tuberkulózy. Hlavnými predstaviteľmi tejto skupiny liečiv je **rifampicín** (RMP) pripravený v roku 1957. Patrí k najúčinnjším antibiotikám, ale veľmi ľahko naň vzniká rezistencia, preto sa podáva v kombináciách. Jeho

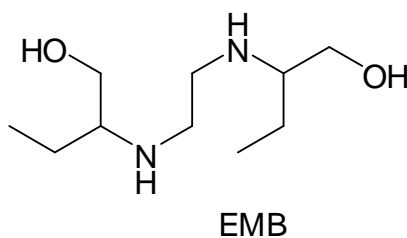
MIC je 0,06-0,5 $\mu\text{g/ml}$. Novšími derivátmi rifampicínu sú rifapentín, rifametan či rifabutín. Medzi nepriaznivé účinky patrí hepatotoxicita, príznaky podobné chrípke, sfarbuje telové tekutiny do oranžova a je induktorom cytochrómu p450, čím okrem iného môže spôsobiť i zlyhanie účinku kontraceptív.



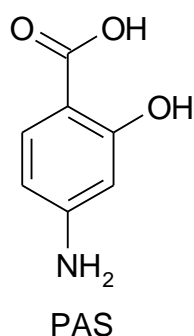
Ďalšou látkou je ^{RMP} **streptomycín** (STM). Je to aminoglykozidové ATB. Zasahuje do proteosyntézy baktérií. Vytvára väzbou na 30 S podjednotku ribozómu poruchu dekódovania mRNA, čo vedie k inkorporácii nesprávnych aminokyselín do polypeptidového reťazca a tým ku znehodnoteniu syntetizovanej bielkoviny. Tieto falošné bielkoviny sa môžu zabudovávať do cytoplazmatickej membrány a tým zvýšiť ich permeabilitu. Baktérie strácajú esenciálne zložky. Pripravený bol už v roku 1943. Jeho MIC je 0.25-2 $\mu\text{g/ml}$. Musí sa podávať i.m., prípadne i.v., pretože po p.o. podaní sa nedostatočne resorbuje. Streptomycín pôsobí negatívne hlavne na ôsmy hlavový nerv (*n. statoakusticus*). Rovnako ako ostatné aminoglykozidy má nízky terapeutický index a pri vyšších koncentráciách je nefrotoxický.



Ethambutol (EMB) je chemoterapeutikum s bakteriostatickým účinkom. Pôsobí len na aktívne rastúce formy. Prvýkrát bol syntetizovaný v roku 1962. MIC má 0.95-7,5 $\mu\text{g/ml}$. Zasahuje do syntézy arabinogalaktanu, nutného pre zachovanie integrity mykobakteriálnej steny. Miestom toxického pôsobenia látky je optický nerv. Spôsobuje poruchy farebného videnia a zrakovej ostrosti. Môže viesť až k slepote.

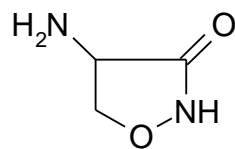


Inhibičné účinky ***p*-aminosalicylovej kyseliny** (PAS) na rast mykobaktérií boli prvýkrát zaznamenané v roku 1944 Lehmannom. Jej inhibičná koncentrácia je 1-10 $\mu\text{g/ml}$. Predpokladaným mechanizmom účinku je inhibícia syntézy kyseliny listovej. Výhodou tejto látky je nízka cena, jednoduchá výroba a dobrá absorpcia a distribúcia. Medzi nevýhody patria časté gastrointestinálne obtiaže, alergické reakcie, rýchly rozvoj rezistencie a časté hypersenzitívne reakcie. Vo vyspelých krajinách sa prakticky nepoužíva.¹⁰



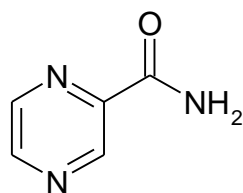
Cykloserín je antibiotikum produkované *Streptomyces orchidaceus*. Je používaný od roku 1952 a má MIC 6-25 $\mu\text{g/ml}$. Inhibuje inkorporáciu D-alaninu do štruktúry peptidoglykanu inhibíciou enzýmov dipeptidsyntetázy a alaninracemázy. To narušuje integritu bunkovej steny. Spozorované toxické

účinky boli prevažne neurologického charakteru (bolesti hlavy, zmätenosť, tras, kŕče). V terapii sa používa iba v prípadoch zlyhania vyššie uvedených liečiv, alebo v prípade rezistentných kmeňov.¹¹



Cykloserin

1.4.1 Úloha pyrazínamidu v terapii tuberkulózy



PZA

Pyrazínamid bol objavený v roku 1952 a krátko na to aj zavedený do praxe, ale v terapii tuberkulózy našiel uplatnenie až od polovice osemdesiatych rokov. Dnes patrí k liečivám prvej línie a používa sa takmer vo všetkých liekových kombináciách, hlavne v kombinácii s izoniazidom a rifampicínom. Využíva sa jeho účinku proti spiacim a polospiacim mykobaktériám na rozdiel od ostatných antituberkulotík, čo umožňuje skrátenie terapie tuberkulózy z pôvodných 9 mesiacov na 6 pri dodržiavaní liečebného režimu. Pyrazínamid je účinný v kyslom prostredí, čo je výhodné, pretože pomaly množiace sa mykobaktérie sú lokalizované v kavernách vzniknutých premenov makrofágov, kde je pH nízke.

Predpokladaným miestom účinku pyrazínamidu (PZA), sú amidázy (napr. izonikotinamidáza), ktoré menia neaktívny pyrazínamid na kys. pyrazínkarboxylovú. Vlastný inhibičný účinok je pripisovaný jednak inhibovaniu enzýmu FAS I (fatty acid synthetase) čo je enzým prítomný okrem mykobaktérií aj v eukaryotických bunkách a má za úlohu syntetizovať vyššie mastné kyseliny ako súčasti mykolových kyselín. Tento predpoklad sa zatiaľ nepotvrdil a je predmetom niektorých výzkumov. Podľa iných štúdií hromadenie kyseliny pyrazínkarboxylovej vedie k zníženiu pH vo vnútri mykobakteriálnej bunky, čo má za následok zníženie membránového potenciálu a neschopnosť prijímať esenciálne látky ako sú uracil, methionín alebo serín. Tomu nasvedčuje aj fakt že pyrazínamid je aktívnejší proti starším, málo množiacim sa mykobaktériám, u ktorých je membránový potenciál vyšší, než u mladej rýchle množiacej sa populácie.¹²

Pyrazínamid môžeme vnímať ako proliečivo, ktoré je ako neutrálna molekula transportovaná cez mykobakteriálnu membránu a intracelulárne je

pomocou bakteriálnej pyrazínamidázy, eventuálne izonikotínamidázy konvertované na aktívnu formu liečiva, kys. 2-pyrazínkarboxylovú.

MIC pyrazínamidu je 50-100 µg/ml pri pH 5.5 – 6 čo je veľmi vysoká hodnota, ak uvážime, že pyrazínamid dosahuje plazmatických koncentrácií 30 – 60 µg/ml. Pri efektívite nižších koncentrácií pyrazínamidu sa uplatňujú aj ďalšie faktory, ktoré posilňujú účinok a to je pH, prítomnosť železitých iónov alebo stupeň prekyslíčenia.¹³

Najzávažnejším vedľajším účinkom pyrazínamidu je poškodenie pečene. Práve hepatotoxicita je dôvod prečo pacienti liečení touto látkou sú neustále sledovaní a pravidelne sa im robia krvné testy aby sa zabránilo rozsiahlym a nevratným poškodeniam pečene. Ďalším nežiadúcim účinkom je inhibícia vylučovania kyseliny močovej, čo vedie k hyperurikémii až k dne. Z menej závažných vedľajších efektov môžu byť pozorované nauzea, zvracanie, nechutenstvo alebo únava.

Základný kameň liečby tuberkulózy robí z pyrazínamidu schopnosť cieľovať “spiace“ mykobaktérie (mykobaktérie so spomalenou látkovou výmenou), preto je dôležitou látkou v terapii tuberkulózy a pre ďalší výskum.¹⁴

1.4.2 Lieková rezistencia

V súčasnosti najväčším problémom v terapii tuberkulózy je rezistencia na podávané antituberkulotiká. Rezistencia je daná mutáciou v génoch kódujúcich syntézu enzýmov, ktoré aktivujú molekulu antituberkulotika, prípadne sú inhibované molekulou antituberkulotika. Výsledkom tejto mutácie je začlenenie inej aminokyseliny do štruktúry molekuly enzýmu. Tým sa zmení štruktúra aktívneho miesta, kde sa aktivuje liečivo, alebo kde sa viaže antituberkulotikum s inhibičným účinkom. Príčinou vzniku rezistencie bola v minulosti nevhodne predpisovaná terapia jedným liekom, ale aj nepravidelné užívanie antituberkulotík pacientmi. To malo za dôsledok nedostatočnú koncentráciu antituberkulotika v mieste potreby a teda napomáhalo vzniku rezistentných mutantov. V praxi sa tento problém rieši používaním kombinácií rôznych liečiv, u ktorých musí byť stanovená minimálna inhibičná koncentrácia, aby sa dalo zistiť, na ktoré lieky je konkrétny kmeň rezistentný. Novšou metódou je PCR stanovenie mutácií spojených s rezistenciami na konkrétne liečivá. Výsledok je známy v rovnaký deň ako sa robí test.

V posledných rokoch si vysokú pozornosť zasluhuje vznik kmeňov s rezistenciou na niekoľko antituberkulotík súčasne. Označujú sa skratkou MDR (**m**ulti **d**rug **r**esistance) a definované sú ako mykobaktérie súčasne rezistentné na INH, RMP a ďalšie štruktúry. V New Yorku bol dokonca popísaný takzvaný W kmeň tuberkulózy, ktorý bol rezistentný hneď na niekoľko liečiv súčasne (INH, RMP, STM, ETA, EMB a tiež kanamycín a chinolóny). V prípadoch MDR tuberkulózy je nutná terapia liekmi druhej a tretej línie, ktoré majú vyššiu toxicitu a tým pádom je nutná aj hospitalizácia a sledovanie vedľajších účinkov. Samotná terapia by sa podľa WHO mala predĺžiť na 18 mesiacov. Z toho vyplýva, že terapia MDR tuberkulózy bude aj finančne náročnejšia. V praxi sa tým zaoberá liečebná stratégia DOTS plus.

Základným pravidlom je nepridávať žiadne liečivo jednotlivo k terapii, ktorá už zlyhala, pretože je to najistejšia cesta k nárastu počtu rezistentných kmeňov.⁶

1.5 STRATÉGIA VÝVOJA NOVÝCH ANTITUBERKULOTÍK

Od roku 1990, spolu s rozšírením AIDS a objavením sa MDR kmeňov tuberkulózy, rapídne vzrástla snaha o objavovanie nových, výhodnejších antituberkulotík. Rovnako vzrástla aj snaha o pochopenie pôvodcu ochorenia, jeho biochemických pochodov, pretože rôzne stupne syntézy esenciálnych látok môžu byť cieľom pre antituberkuloticky aktívne látky. Napríklad zmapovanie genómu *mykobacteria tuberculosis* nám poskytuje dôkladný obraz o jeho metabolických procesoch. Môžeme zasahovať do biosyntézy polymérov v mykobaktériálnej bunkovej stene (napr. glykozylácia, biosyntéza mastných kyselín a biosyntéza kyseliny diaminopimelovej). Dôležité môžu byť aj gény ovplyvňujúce latenciu a virulenciu.

Vývoj antituberkulotík prebieha obdobnými spôsobmi ako u iných liečiv, s tým rozdielom, že terapia tuberkulózy zahrňuje dlhodobé podávanie liečiv. Preto sú dôležité tri aspekty:

1. Ekonomicky výhodné liečivo, aby bolo dostupné pre všetky sociálne-ekonomické skupiny ľudí
2. Liečivo s vysokou afinitou k mykobaktériám, aby nebola narušená prirodzená mikróflóra pacienta, prípadne aby sa nerozvíjali rezistentné kmene iných patogénov
3. Liečivo s dobrou biologickou dostupnosťou, aby bol obmedzený výskyt vedľajších účinkov

Pri hľadaní potenciálnych účinných látok proti tuberkulóze sa postupuje nasledovnými spôsobmi:

1. Najdôležitejšia je metóda screeningu, tj. snaha objaviť liečivo s novým mechanizmom účinku alebo s aktivitou i proti kmeňom s MDR.
2. Hľadajú sa aj látky so zameraním na určitú cieľovú skupinu, u mykobaktérií najčastejšie polyméry bunkovej steny.
3. V neposlednej rade je to tvorba analógov už existujúcich liečiv so zlepšeným terapeutickým indexom, s aktivitou proti senzitívnym kmeňom a so zlepšenou biologickou dostupnosťou.¹⁵

1.6 DOTS

DOTS (directly observed treatment short-course) je dnes nejefektívnejšia stratégia kontroly TBC, ktorej cieľom je priama alokácia zdrojov a ich posledných kontaktov na rýchlu diagnostiku TB, dohľad nad správnu prevenciou (očkovaním) a liečbou infikovaných osôb, pričom liečba musí pozostávať zo správnej kombinácie liekov a zo správneho spôsobu a doby ich užívania. DOTS je liečebná stratégia, ktorá lieči pacientov, zachraňuje životy, je prevenciou vzniku rezistencie na liečbu a znižuje možnosti prenosu ochorenia z infikovaného jedinca na zdravého. Novou výzvou pre DOTS je dnes hlavne nedostatočná primárna starostlivosť (nutné reformy v zdravotníctve), zhoršujúce sa epidémie HIV a vznik rezistentných kmeňov mykobaktérií.

Existuje päť hlavných bodov stratégie DOTS:

- záväzok vlád jednotlivých krajín o vytrvalej kontrole aktivít TBC a financovaní liečebných postupov
- detekcia a kontrola prípadov pomocou kvalitného bakteriologického vyšetrenia sputa u symptomatických pacientov
- štandardizovaný liečebný režim pre všetkých pacientov s lekárske dozorom a spoluprácou pacienta
- efektívny management a dodávanie základných antituberkulotík
- štandardizovaný systém dokumentácií a hlásení, ktorý dovoľí posúdenie liečebných výsledkov každého pacienta a tiež posúdenie celkového plnenia programu kontroly TBC.

Liečebný režim spočíva v pravidelnom podávaní liekových kombinácií zostavených na základe znalostí účinkov jednotlivých liečiv, ich znášateľnosťou a citlivosťou konkrétneho kmeňa mykobaktérií.

V rozvinutých krajinách sa používa celkom 6 hlavných liečiv: INH, RMP, PZA, EMB, STM a tiež thioacetazón (TAA). V rozvojových krajinách iba INH, PZA a TAA. Množstvo liečených je pod 50 % chorých, pričom až 60 % neliečených zomiera.⁶

1.7 ZHRNUTIE

Na záver je dobré uviesť základné body súvisiace s ochorením:

1. TBC se častejšie prejaví u detí než u dospelých
2. Najväčšie riziko predstavuje pre pacientov s imunosupresiou (AIDS)
3. Reaktivácia latentnej TBC súvisí s oslabením organizmu (imunosupresiou, vekom, malnutríciou, stresom...)
4. TBC je extrémne infekčná, pre nákazu prenášanú vzduchom stačia 1-2 mykobaktérie
5. TBC je obvykle liečiteľná náležitou medikáciou (časovo náročnou)
6. Rezistentná TBC môže byť spôsobená infekciou rezistentným kmeňom, ale aj noncompliance pacienta
7. TBC je obvykle pľúcna, ale u detí a imunosuprimovaných pacientov sa vyskytujú aj iné formy
8. Jednoročná liečba nekomplikovanej infekcie u dospelých je z 90 % úspešná (pri dôslednom podávaní liekov až z 99 %)

1.8 CIEĽ PRÁCE

Hľadanie nových antituberkulotických liečiv dnes znovu nadobúda na význame. Dôvodom je stále častejší výskyt tuberkulózy vo svete, súčasne so vznikajúcou rezistenciou na doposiaľ objavené liečivá (čím ďalej, tým väčšie riziko vzniku MDR). Rovnako dôležitý je aj fakt, že 31 % pacientov s AIDS zomiera práve kvôli nakazeniu tuberkulózou. V neposlednej rade pre urýchlenie a zlepšenie terapie TBC.

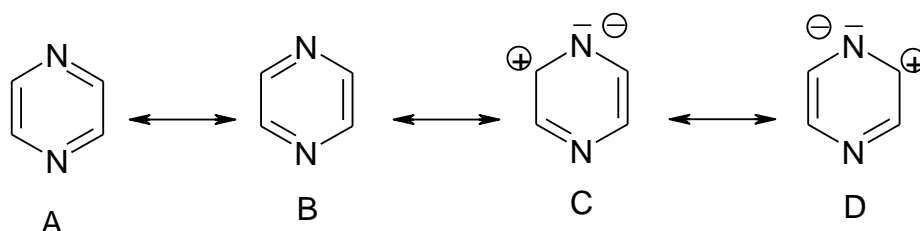
Katedra farmaceutickej chémie a kontroly liečiv FaF UK v Hradci Králové sa dlhodobo zaoberá syntézou potenciálnych antituberkulotík. Táto diplomová práca je príspevkom k riešeniu tohoto výskumného projektu katedry.

Cieľom diplomovej práce je príprava série látok typu *N*-substituovaných derivátov 3-amino-pyrazín-2,5-dikarbonitrilu, prípadne 3-amino-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu, ktoré majú v polohe 3 pyrazínového jadra zavedený substituent typu primárneho aromatického amínu. V náväznosti na práce z predchádzajúcich rokov je predmetom štúdia vplyv substituentov na tomto aromatickom jadre a ich hydro-lipofilných vlastností na výslednú účinnosť.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 VLASTNOSTI PYRAZÍNOVÉHO JADRA

Pyrazín má vysoko symetrickú molekulu. Pyrazínový kruh môžeme znázorniť ako rezonančný hybrid štruktúr (Obr. 2). Jedná sa o slabo aromatickú zlúčeninu (Tab. 1), ktorá sa svojimi vlastnosťami blíží vlastnostiam terciálnych alifatických amínov. Pyrazín sa chová ako slabá dvojsytná báza (Tab. 1), ktorá v porovnaní s ostatnými diazínmi a pyridínom je najslabšou bázou.¹⁶



Obr. 2: Rezonančné štruktúry pyrazínového jadra

Z porovnania hodnôt hustoty π -elektrónov v pyrazínovom a pyridínovom kruhu (Obr. 3) je zrejmé, že hustota π -elektrónov je zvýšená na dusíkových atómoch, zatiaľ čo na uhlíkových atómoch je hustota výrazne menšia. Vypočítané hodnoty se od nameraných takmer nelíšia. Je vidieť, že hustoty π -elektrónov na α -uhlíkoch pyrazínu a pyridínu sú veľmi podobné a dá sa očakávať aj podobná chemická reaktivita α -substituovaných pyrazínov a pyridínu.¹⁷



Obr. 3: Hustota π -elektrónov v pyrazínovom a pyridínovom kruhu

Medziatómové vzdialenosti sú v pyrazíne a ostatných diazínach síce podobné, ale poloha druhého dusíkového atómu značne ovplyvní geometriu molekuly. V prípade pyrazínamidu je pyrazínový kruh planárny, vzdialenosť C-H

je 13.48 nm, C-C potom 13.83 nm. Vplyvom amidovej skupiny dochádza k pretiahnutiu pyrazínového jadra, takže uhol tvorený N¹, α- a β-uhlíkom je o 5° ostrejší než v nesubstituovanom pyrazíne.¹⁸

Pyrazín, rovnako ako ostatné diazíny, nepodlieha ľahko elektrofilným substitúciám. Výhodnejšie sú substitúcie nukleofilné, obzvlášť v prípade, keď sa pyrazínový kruh aktivuje prevedením na N-oxid.¹⁹

Infračervené spektrá pyrazínov a pyrazín-N-oxidov vykazujú 4 rozťahnuté ν -vibrácie v oblasti 1600-1370 cm⁻¹. Vibrácie v rozmedzí 1600-1575 cm⁻¹ majú rôznu (väčšinou slabú) intenzitu, v oblasti 1500-1520 cm⁻¹ slabú až stredne silnú intenzitu, v oblasti 1500-1465 a 1420-1370 cm⁻¹ sa nachádzajú vibrácie stredne silnej intenzity. Valenčné vibrácie N-oxidov sa objavujú v oblasti 1350-1260 cm⁻¹ a majú silnú intenzitu. U monosubstituovaných pyrazínov sa vyskytuje ešte silný pás v oblasti 1060-1040 a 1030-1010 cm⁻¹. Navyše majú pyrazínové deriváty ešte mimorovinné σ (CH) vibrácie kruhu v oblasti 860-800 cm⁻¹. U nesubstituovaných pyrazínov táto vibrácia klesá pod 800 cm⁻¹. Substituentom sa -M efektom posúvajú hodnoty vlnočtov vibrácií k vyšším medziam, substituenty s +M efektom tieto hodnoty znižujú.²⁰

Príklady hodnôt vlnočtov a vibrácií pyrazínu sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1: Súhrn charakteristík pyrazínov

Percento aromaticity	pKa (1. stupeň)	Vibrácie a vlnočty	
		ν aromatického kruhu	σ (CH)
75	0,65	1488,1414,1150,1130,1063,1018	784

2.2 PRÍPRAVA HALOGÉNDERIVÁTOV

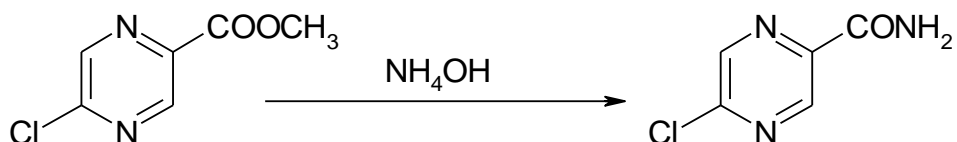
Halogénderiváty pyrazínov sa najčastejšie získavajú nukleofilnou halogenáciou N-oxidov pyrazínov. Podľa japonských autorov²¹ závisí výsledok chlorácie (pomocou chloridu thionylu, chloridu fosforylu alebo acetylchloridu) na jadre substituovaných pyrazín-4-oxidov na charaktere substituentu. Substituenty sa -M efektom určujú vstup atómu chlóru do polohy 6 u 2-substituovaných pyrazín-4-oxidov a za súčasnej deoxygenácie vznikajú 2,6-disubstituované pyrazíny. U substituentov so slabým +M efektom vzniká zmes 2,3- a 2,6-disubstituovaných derivátov pyrazínu.

Najnovšie poznatky v tejto oblasti zhrnul Sato, podľa ktorého miesto vstupu chlóru u 2-substituovaného pyrazín-4-oxidu pri reakcii s chloridom fosforylu je ovplyvnené nielen charakterom substituenta, ale i reakčnou dobou. Okrem reakcie 2-aminopyrazín-4-oxidu s chloridom fosforylu je vo všetkých ostatných prípadoch uprednostneným produktom 2,6-disubstituovaný pyrazín. Súčasne však vznikajú rôzne množstvá 2,3- a 2,5-disubstituovaných derivátov.^{22,23,24}

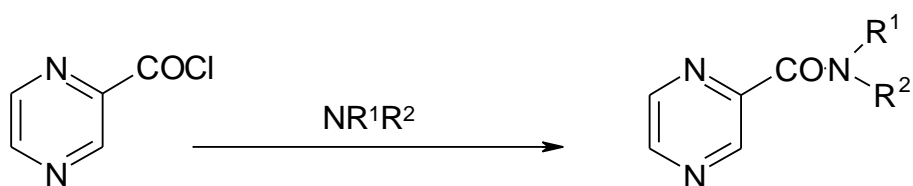
U 2-substituovaných pyrazín-4-oxidov substituent s +M efektom potlačí atak atómu chlóru na α -uhlík vzhľadom k N-oxidovému zoskupeniu a uhlík v polohe 5. Ako vedľajší produkt vzniká 2,3-disubstituovaný derivát vedľa veľmi malého množstva 2,5-izoméru. Substituent s -M efektom tento atak naopak uľahčí, takže vznikajú ako vedľajšie produkty 2,3-disubstituované pyrazínové deriváty s väčším množstvom 2,5-izomérov než v predchádzajúcom prípade. Uprednostnením vstupu atómu chlóru na β -uhlík vzhľadom k N-oxidovej funkcii je spôsobené -M efektom neoxidovaného atómu dusíku v pyrazínovom jadre. Tento vplyv je najviac posilnený prítomnosťou substituentov s -M efektom v jeho blízkosti.²⁵

2.3 PRÍPRAVA AMIDOV

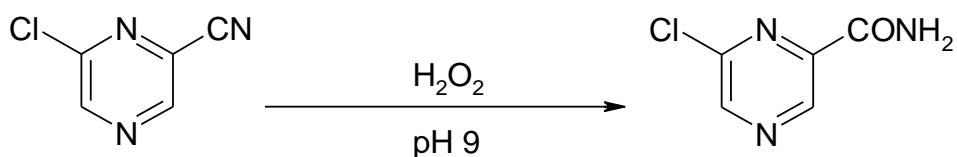
K príprave amidov možno použiť amonolýzy, prípadne aminolýzy esterov pyrazínkarboxylových kyselín.



Amidy môžeme získať i z chloridov kyselín. K syntéze substituovaných amidov použil Kushner ako počiatočnú látku zlúčeninu chlorid pyrazínkarboxylovej kyseliny, ktorý reagoval s primárnymi či sekundárnymi amínmi za vzniku mono- alebo disubstituovaných amidov.²⁶



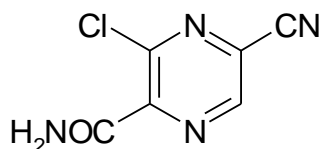
Ďalším spôsobom prípravy je parciálne zmydelnenie nitrilov peroxidom vodíku pri pH 9 (tzv. Radiszewského metóda).²⁷



K modernejším metódam patrí homolytická amidácia. Zdrojom amidového radikálu je formamid s redoxným systémom tvoreným peroxidom vodíka a Fe⁺², *di*terc-butylperoxidom a Fe⁺², *di*terc-butylperoxidom, dibenzoylperoxidom, peroxidisíranom amónnym či draselným a Fe⁺² či Ag⁺, alebo peroxidisíranom amónnym či draselným za zvýšenej teploty.²⁸

Iné štúdie ukazujú, že vlastnosti už prítomného substituentu podmieňujú, ktoré miesto pyrazínového kruhu bude radikálom atakované. U

monosubstituovaného pyrazínového derivátu substituent s +M efektom (-Cl, -OCH₃, -NH₂) usmerňuje vstup radikálu prednostne do polohy 3 a vzniká 2,3-disubstituovaný pyrazín. Substituent s -M efektom (-COOC₂H₅, -CONH₂, -CN) riadi atak radikálov prednostne do polohy 5 a vzniká 2,5-disubstituovaný pyrazín. Pri amidácii 6-chlorpyrazín-2-karbonitrilu, ktorý obsahuje oba typy substituentov, tj. s +M efektom i s -M efektom, sa získa amid 5-kyan-3-

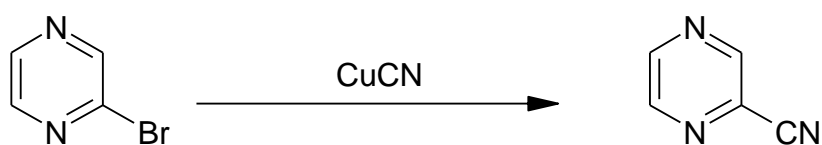


chlorpyrazín-2-karboxylovej kyseliny.²⁹

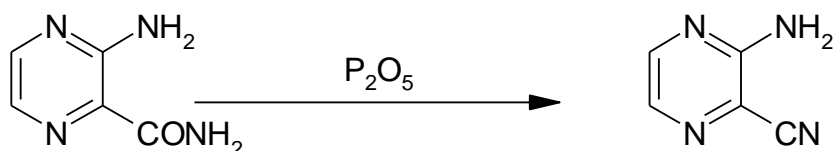
2.4 PRÍPRAVA NITRILOV

Pyrazínkarbonitrily sa dajú získať, okrem totálnej syntézy pyrazínového cyklu, i klasickými metódami, napr. zahrievaním halogénovaných zlúčenín s kyanidom meďným a dehydratáciou amidov.

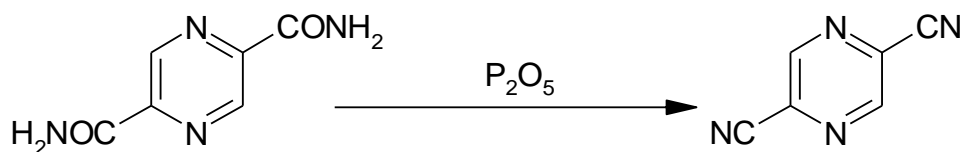
Karmas a Spoerri pripravili sériu rôznych substituovaných nitrilov pôsobením kyanidu meďného na brómované pyrazíny. Ako reakčné prostredie použili u brompyrazínu pyridín, u ostatných derivátov pyrazínu γ -pikolín.³⁰



Nitrily vznikajú tiež dehydratáciou amidov. Reakcia bola prevedená oxidom fosforečným v prostredí nitrobenzénu, bezvodého pyridínu, toluénu. Zatiaľ čo dehydratácia amidu kyseliny 3-aminopyrazín-2-karboxylovej prebiehala dobre (výťažok 51 %)³¹,



príprava pyrazín-2,5-dikarbonitrilov, ktorý bol získaný pôsobením oxidu fosforečného na diamid pyrazín-2,5-dikarboxylovej kyseliny v prostredí nitrobenzénu. Prebieha s malým výťažkom.³¹

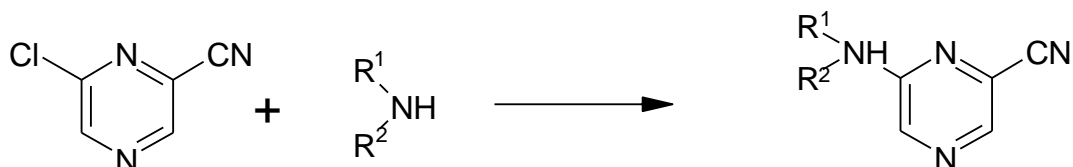


2.5 SUBSTITUČNÉ REAKCIE CHLÓRDERIVÁTOV PYRAZÍNU

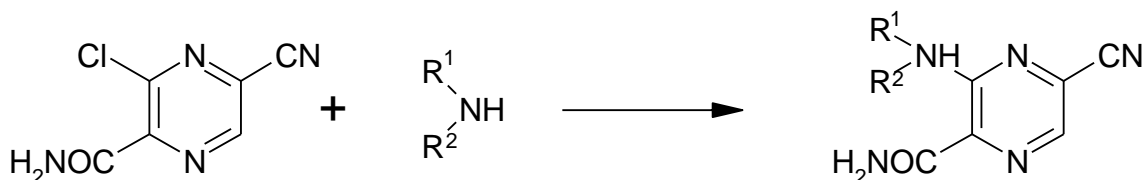
Výmena halogénu za aminoskupinu na arylhalogenidoch vyžaduje spravidla tvrdé reakčné podmienky. Reakciu značnou mierou uľahčuje prítomnosť elektronegatívnych skupín (NO_2 , CN , CONH_2 , COOH), hlavne v polohách *ortho* a *para*. Uskutočniteľnosť substitúcie halogénu vzrastá ďalej s počtom týchto aktivizujúcich skupín.³²



Tieto všeobecné závery možno uplatniť aj v prípade nukleofilnej substitúcie na pyrazínovom jadre. Veľmi dobre prebieha napr. reakcia 6-chloropyrazín-2-karbonitrilu s alifatickými alebo heterocyklickými amínmi, ktorú použil pre prípravu 6-amino-2-kyanpyrazínu Foks.²⁷

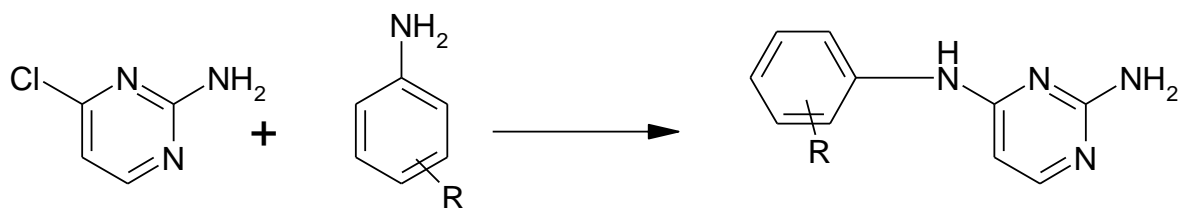


Obdobným spôsobom vo vysokých výťažkoch bola pripravená séria substituovaných 3-amino-5-kyanpyrazín-2-karboxamidov.³³



Pri syntéze arylaminoderivátov dusíkatých šesťčlenných heterocyklov sa dá využiť nukleofilná substitúcia v prevedení podľa Banksa³⁴. Prípravu týchto

látok uskutočňoval Banks vo vodnom prostredí pri kyslom pH. Kyselina chlorovodíková tu vystupuje ako katalyzátor.³⁴

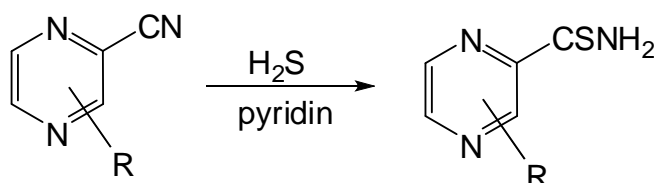


Rozsah reakcie chlórderivátov dusíkatých aromatických heterocyklov s amínmi je v princípe podmienený súhrou dvoch faktorov:

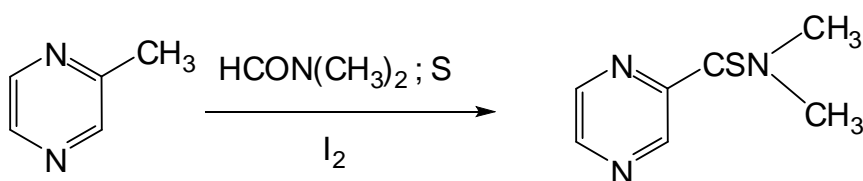
- a) afinitou amínov ku chlórheterocyklickým látkam
- b) afinitou amínov ku kyseline vo vodnom prostredí

2.6 PRÍPRAVA THIOAMIDOV

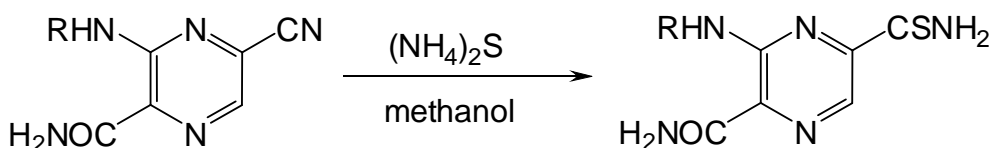
Thioamidy sú veľmi stabilné zlúčeniny oproti väčšine thiokarbonylových zlúčenín. Thioamidy pyrazínkarboxylových kyselín boli syntetizované ako izoestery pyrazínkarboxamidu. Väčšina autorov pri ich syntéze vychádza z vhodne substituovaného pyrazínkarbonitrilu, ktorý adíciou monosulfanu v bazickom prostredí prechádza na odpovedajúci thioamid.³⁵



Ďalším spôsobom prípravy je reakcia N,N-dimethylformamidu s methylpyrazínom v prítomnosti síry a jódu. Reakcia vyžaduje dlhodobé zahrievanie na 150 -160 °C.



Vyhodný spôsob prevedenia nitrilu na thioamid je pomocou sulfidu amónneho. Reakcia prebieha v prostredí methanolu. Týmto spôsobom sú pripravené aj thio-analógy niektorých derivátov pyrazínamidu.³⁶



3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

U všetkých použitých materiálov boli overené fyzikálne konštanty, rozpoušťaďlá boli pred použitím vysušené a čistené obvyklými postupmi.

Priebeh reakcií a čistota finálnych látok boli sledované pomocou tenkovrstvej chromatografie na doskách MERCK Silikagel 60 F₂₅₄ za použitia vyvíjacej sústavy toluén - acetón (1:1) alebo benzín - ethylacetát (4:1). Detekovalo sa pri UV svetle o vlnovej dĺžke 254 nm.

Vzorky boli čistené rekryštalizáciou zo zmesi voda – ethanol, alebo stĺpcovou chromatografiou na prístroji Flash master personal. (Flash Chromatography System, Argonaut, USA). Použitá prietoková rýchlosť bola 30 ml/min., mobilnou fázou bol ethylacetát - hexan (0-20%), ako sorbent bol použitý silikagel (Kieselgel 60, Merck, Germany).

Teploty topenia boli stanovené na mikrovýhrevnom stolíku BOËTIUS PHMK 05 (VEB KOMBINAT NAGEMA, VEB Wägetechnik RAPIDO, Redebeul, DDR), alebo v kapiláre na prístroji STUART MELTING POINT APPARATUS SMP3 (Barloworld Scientific). Teploty topenia sú nekorigované.

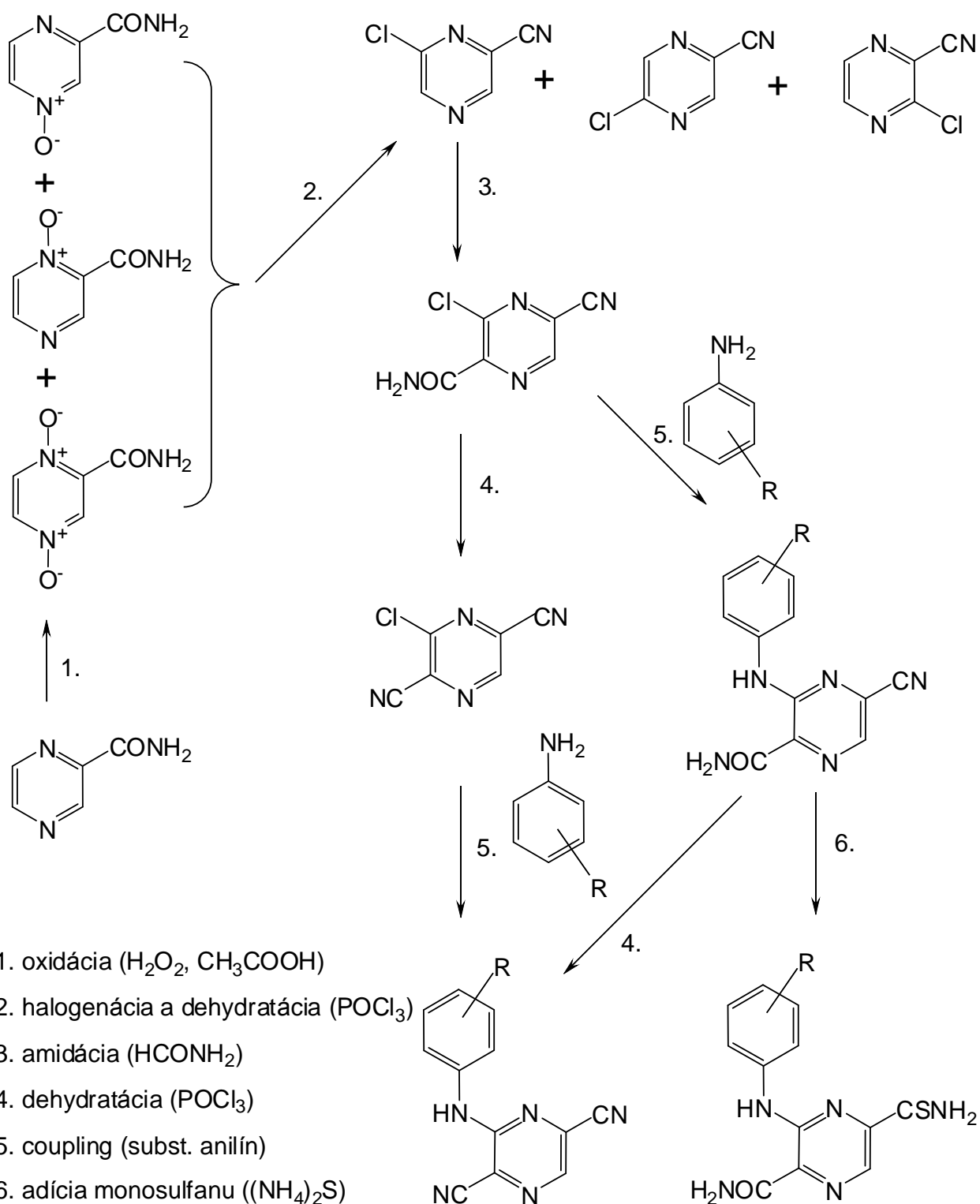
Elementárne analýzy boli uskutočnené na katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv pomocou CHN analyzátoru EA 1110 CE (Fisons Instruments S. p. A., Milano) pani Hronovou.

Infračervené spektrá zmerala pani Vencovská na Katedre anorganickej a organickej chémie na spektrometre Nicolet Impact 400. Látky boli merané v tableťách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 400 mg KBr), vlnopočty sú uvádzané v cm⁻¹.

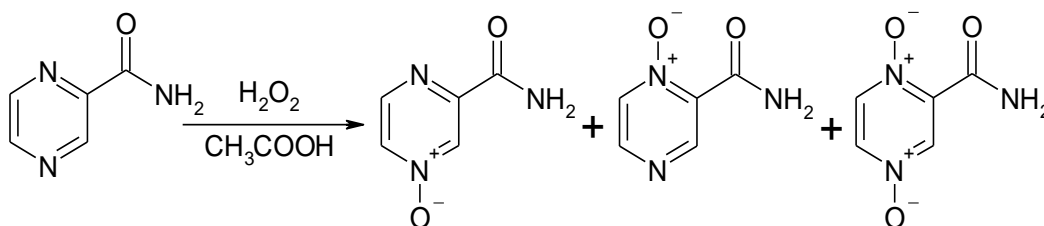
Log *P* zlúčenín bol vypočítaný pomocou programu CS ChemOffice Ultra ver. 10.0 (Cambridgesoft, Cambridge, MA, U. S. A.).

¹H a ¹³C NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Merkur – Vx BB 300 (299,95 MHz – ¹H a 75,43 MHz – ¹³C) Varian (Karlsruhe, Nemecko). Merania uskutočnil a spektrá vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, CSc z KAOCH FaF UK. Chemické posuny sa vzťahujú k Si(CH₃)₄

3.1 SCHÉMA PREVEDENÝCH REAKCIÍ



3.2 PRÍPRAVA 4-N-OXIDU PYRAZÍN-2-KARBOXAMIDU



K roztoku 170 ml (5,5 mol) 30% peroxidu vodíku v 260 ml (4,5 mol) ľadovej kyseliny octovej bolo po častiach pridaných 64 g (0,52 mol) amidu pyrazín-2-karboxylovej kyseliny. Teplota reakčnej zmesi bola zvýšená na 70 °C a ďalej bola udržiavaná medzi 70-80 °C po dobu 6 hodín. Po ochladení bola reakčná zmes ponechaná cez noc v chladničke. Vykryštalizovaný produkt bol odsatý a premytý vodou.

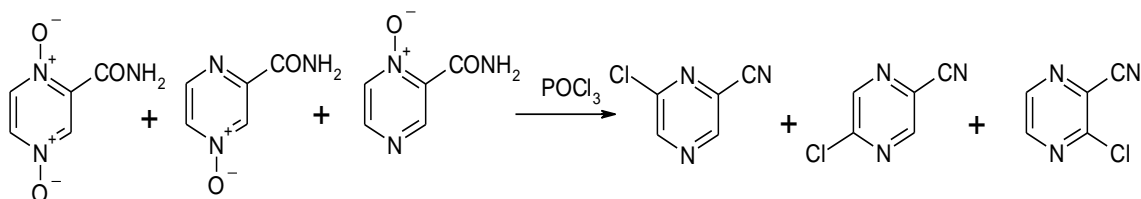
Výtťažok: 24,4 g, tj. 35,3 % teoretického výtťažku.

Sumárny vzorec: C₅H₅N₃O₂

Mol. hmotnosť: 139,11

Teplota topenia : 315 °C (rozkl.)²⁴

3.3 PRÍPRAVA 6-CHLOR-PYRAZÍN-2-KARBONITRILU



K 100 ml (1,12 mol) chloridu fosforylu bolo po častiach pridanych 24,4 g (0,18 mol) zmesi oxidov amidu pyrazín-2-karboxylovej kyseliny (hlavný podiel má 4-N-oxid amidu pyrazín-2-karboxylovej kyseliny). Zmes bola zahrievaná na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Potom bol obsah v banke ochladený na teplotu 10-15 °C a reakčná zmes bola pomaly vyliala na ľad. Teplota pri hydrolýze nesmela prestúpiť 5 °C. Potom bol produkt extrahovaný chloroformom po dobu 48 hodín. Bola získaná reakčná zmes, ktorá bola separovaná chromatograficky za použitia FlashMaster Personal Chromatografy, mobilnou fázou bol hexan ku ktorému bol kontinuálne pridávaný ethylacetát až do výsledného pomeru objemových dielov 4:1. Ďalej boli jednotlivé polohové izoméry detekované pomocou TLC chromatografie.

K nasledujúcej reakcii bol použitý čistý 6-chloropyrazín-2-karbonitril.

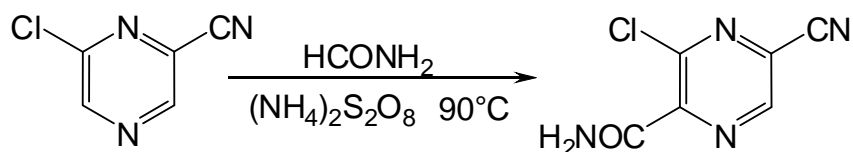
Výťažok: 13,9 g, tj. 57 % teoretického výťažku.

Sumárny vzorec: C₅H₂N₃Cl

Mol. hmotnosť: 139,54

Teplota topenia: 15 °C²⁴

3.4 PRÍPRAVA 3-CHLÓR-5-KYANPYRAZÍN-2-KARBOXAMIDU



V trojhrdlej banke spolu s teplomerom a miešadlom bolo v 86 ml formamidu rozpustených 13,7 g (0,10 mol) 6-chlorpyrazín-2-karbonitrilu. Roztok bol zahriaty na teplotu 90°C a za sústavného miešania bol po častiach pri tejto teplote behom 1,5 hodiny pridávaný pevný persíran amónny (0,13 mol). Po pridaní všetkého množstva bola tmavohnedá zmes miešaná ešte 1 hodinu pri 90 °C. Potom bola reakčná zmes zriedená 100 ml vody, bola odsatá nerozpustená zrazenina a filtrát bol kontinuálne extrahovaný chloroformom po dobu 48 hodín. Po zahustení extraktu (vákuovom oddestilovaní formamidu) bol olejovitý zbytok daný do chladničky na noc.

Vypadnuté kryštály boli odsaté a prekryštalizované z ethanolu. Boli získané kryštály o teplote topenia 246 °C (tj. izomér). Zbytok ethanolického matečného roztoku bol odparený do sucha a prekryštalizovaný z vody, čím bol oddelený žiadaný produkt o teplotě topenia 132-134 °C.

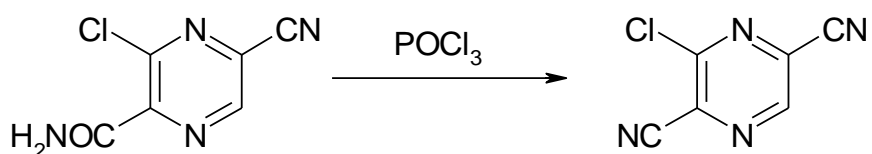
Výtťažok: 3,1 g, tj. 17 % teoretického výtťažku

Sumárny vzorec: C₆H₃N₄OCl

Mol. Hmotnosť: 182,5

Teplota topenia: 132-134 °C, lit. 132-134 °C²⁹

3.5 PRÍPRAVA 3-CHLÓRPYRAZÍN-2,5-DIKARBONITRILU



V banke boli zahrievané pri teplote 105 °C 3g (0,016 mol) 3-chlór-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu s 5,6 ml (0,062 mol) chloridu fosforu po dobu jednej hodiny. Potom bol obsah banky ochladený na 10 - 15°C a reakčná zmes bola opatrne po malých častiach vyliať na ľad. Vzniknutý vodný roztok bol kontinuálne extrahovaný chloroformom, ktorý bol potom oddestilovaný.

Produkt reakcie bol následne prekryštalizovaný zo zriedeného ethanolu.

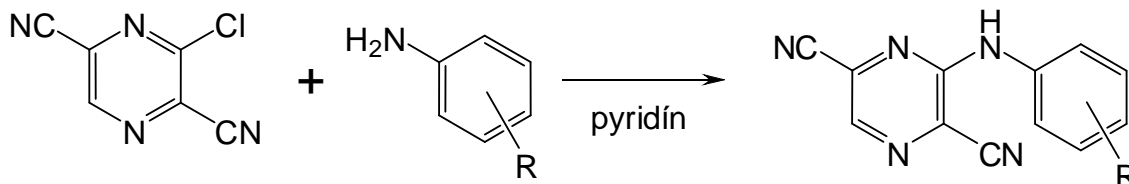
Výtťažok: 1,25 g, tj. 47 % teoretického výtťažku

Sumárny vzorec: C₆H₄N₄Cl

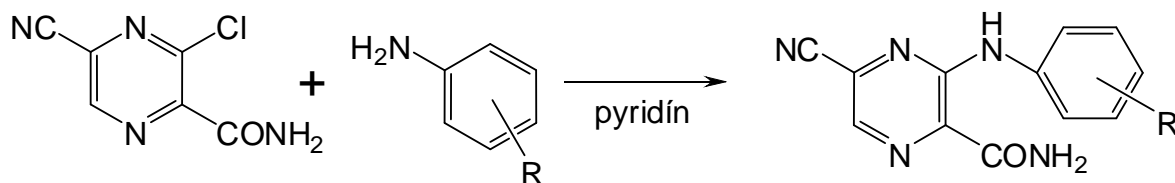
Mol. hmotnosť: 164,5

Teplota topenia: 116-118 °C, lit. 116-118 °C³⁷

3.6 VŠEOBECNÝ POSTUP PRÍPRAVY N-SUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTOV 3-AMINO-5-KYANPYRAZÍN-2-KARBOXAMIDOV A 3-AMINO-PYRAZÍN-2,5-DIKARBONITRILOV

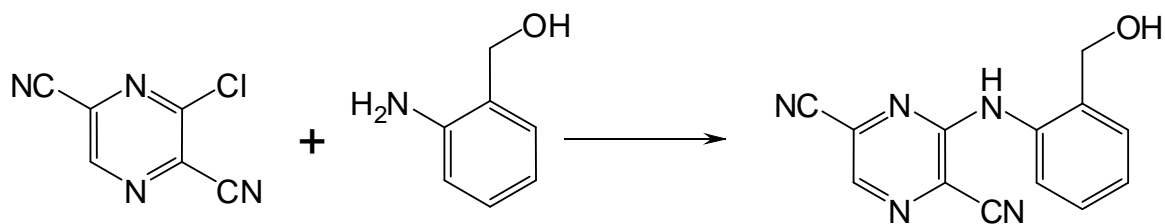


V 30 ml bezvodého toluénu bolo rozpustených 100 mg (0,612 mmol) 3-chlór-pyrazín-2,5-dikarbonitrilu. K tomuto roztoku bolo pridané 48 mg pyridínu (ekvimolárne množstvo) a 1,1 ekvivalentu substituovaného anilínu. Reakčná zmes bola privedená k varu pod spätným chladičom, reakčná teplota bola 125-130 °C. Zmes bola zahrievaná po dobu 6 hodín. Po ochladení bolo za zníženého tlaku oddestilované rozpúšťadlo. Produkt bol vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie, za použitia sústavy hexan – ethylacetát. Podiel ethylacetátu bol v každých 50ml mobilnej fázy o 1 % vyšší. Zvyšoval sa z 0 % na 20 %.²⁰



Pri príprave derivátov amino-5-kyanpyrazín-2-karboxamidu bolo postupované rovnakým spôsobom. Jediným rozdielom bolo nahradenie záverečnej fáze čistenia produktu stĺpcovou chromatografiou, niekoľkonásobným filtrovaním s pridaním aktívneho uhlia a opakovaným prekryštalizovaním z ethanolu a vody.²¹

3.6.1 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu



Výťažok: 26 mg, tj. 17,5 % teoretického výťažku

Sumárny vzorec: C₁₃H₉N₅O

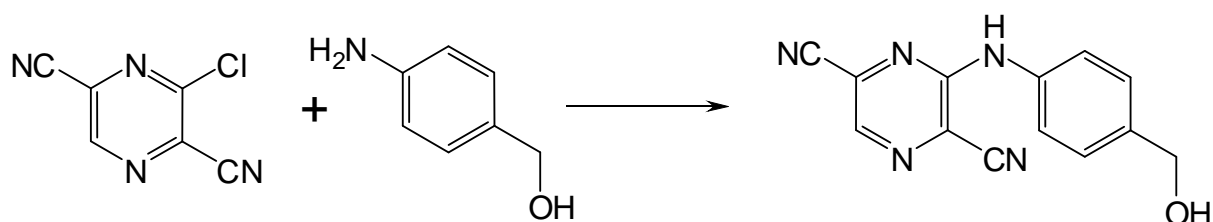
Molárna hmotnosť: 251,24

Teplota topenia: 197 – 198 °C

Elementárna analýza	C	H	N	O
Vypočítaný obsah [%]	62,15	3,61	27,87	6,37
Nameraný obsah [%]	64,13	4,07	26,22	-

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3209, ν (CN) 2240, ν (benzen. jadro) 1624, ν (pyrazin. kruh) 1478, 1401, 1291, 1132

3.6.2 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu



Výtťažok: 16,7 mg, tj. 11,3 % teoretického výtťažku

Sumárny vzorec: C₁₃H₉N₅O

Molárna hmotnosť: 251,24

Teplota topenia: 212 – 214 °C

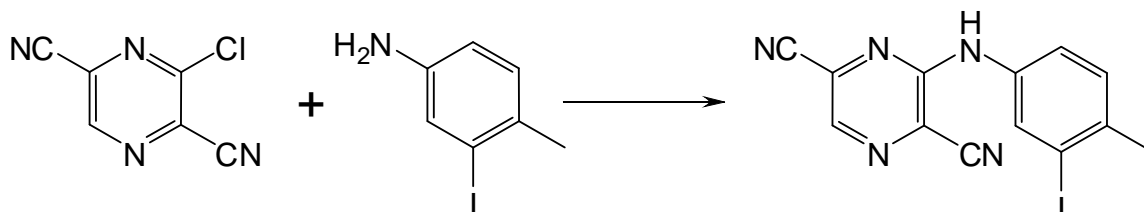
Elementárna analýza	C	H	N	O
Vypočítaný obsah [%]	62,15	3,61	27,87	6,37
Nameraný obsah [%]	63,04	3,85	27,13	-

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3209, ν (CN) 2230, ν (benzen. jadro) 1628, ν (pyrazin. kruh) 1425, 1261, 1196, 1143

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 9.07 (s, 1H, NH), 8.48 (s, 1H, H5), 7.59 (d, 2H, H2', H6'), 7.37 (d, 2H, H3', H5'), 5.27 (s, 1H, OH), 4.61 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 153.9, 140.6, 138.1, 136.9, 130.6, 127.9, 127.9, 123.5, 123.5, 116, 114.9, 114.9, 64.2

3.6.3 Príprava 3-(3-íodo-4-methylfenylamino)-pyrazin-2,5-dikarbonitrilu



Výtěžok: 80 mg, tj. 36,45 % teoretického výtěžku

Sumárny vzorec: C₁₃H₈N₅I

Molárna hmotnosť: 361,14

Teplota topenia: 181 - 183 °C

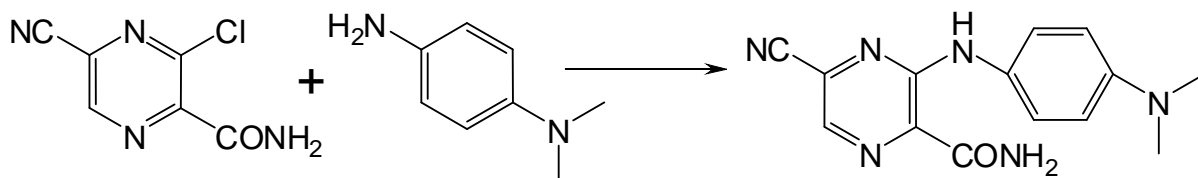
Elementárna analýza	C	H	N	I
Vypočítaný obsah [%]	43,23	2,23	35,14	19,39
Nameraný obsah [%]	42,05	2,46	36,31	20,18

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3210, ν (CN) 2238, ν (benzen. jadro) 1610, ν (pyrazin. kruh) 1477, 1368, 1271, 1201

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 9.95 (s, 1H, NH), 8.36 (s, 1H, H5), 7.49 (m, 1H, H6'), 7.27 (m, 1H, H5'), 6.98 (m, 1H, H2'), 2.43 (s, 3H, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 152.1, 139.4, 137.6, 134.3, 131.7, 130.0, 129.9, 121.5, 118.7, 114.5, 113.5, 100.7, 27.5

3.6.4 Príprava 3-(4-N,N-dimethylamino-fenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid



Výtazok: 44 mg, tj. 28,46 % teoretického výtazku

Sumárny vzorec: C₁₄H₁₄N₆O

Molárna hmotnosť: 282,30

Teplota topenia: 217 – 219 °C

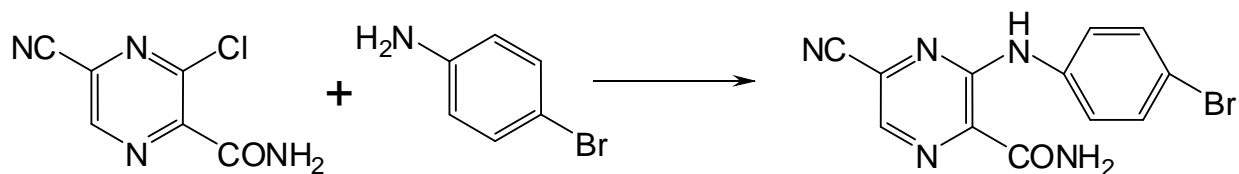
Elementárna analýza	C	H	N	O
Vypočítaný obsah [%]	59,56	5,00	29,77	5,67
Nameraný obsah [%]	60,13	4,66	29,43	-

IČ spektrum: ν (CH₃) 2290, ν (CN) 2242, ν (CO) 1695, ν (benzen. jadro) 1618, ν (pyrazin. kruh) 1463, 1350, 1282, 1195

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 10.79 (s, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, H5), 7.79 (s, 2H, CONH₂), 7.47 (d, 2H, H3', H5'), 6.73 (d, 2H, H2', H6'), 2.96 (s, 6H, CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 167.6, 151.6, 148.0, 133.2, 131.0, 128.7, 127.0, 122.7, 122.7, 115.5, 112.9, 112.9, 40.8, 40.8

3.6.5 Příprava 3-(4-brómfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid



Výtěžok: 132 mg, tj. 75,74 % teoretického výtěžku

Sumárny vzorec: C₁₂H₈N₅OBr

Molárna hmotnosť: 318,13

Teplota topenia: 196 – 198 °C

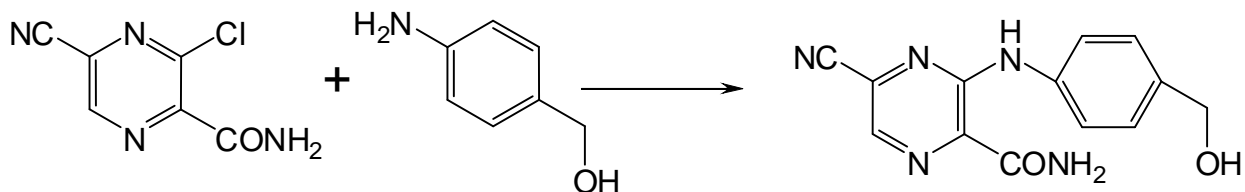
Elementárna analýza	C	H	N	O	Br
Vypočítaný obsah [%]	45,31	2,53	22,01	5,03	25,12
Nameraný obsah [%]	46,02	2,42	21,97	-	24,43

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3220, ν (CN) 2242, ν (CO) 1680, ν (benzen. jadro) 1618, ν (pyrazin. kruh) 1463, 1350, 1282, 1195

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 11.19 (s, 1H, NH), 8.18 (s, 2H, CONH₂), 7.8 (s, 1H, H5), 7.58 (d, 2H, H3', H5'), 7.44 (d, 2H, H2', H6')

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 167.3, 151.18, 136.82, 134.5, 132.0, 132.0, 130.59, 129.2, 122.27, 122.27, 116.8, 115.2

3.6.6 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid



Výtťažok: 27 mg, tj. 10,83 % teoretického výtťažku

Sumárny vzorec: C₁₃H₁₁N₅O₂

Molárna hmotnosť: 269,26

Teplota topenia: 205 - 207°C

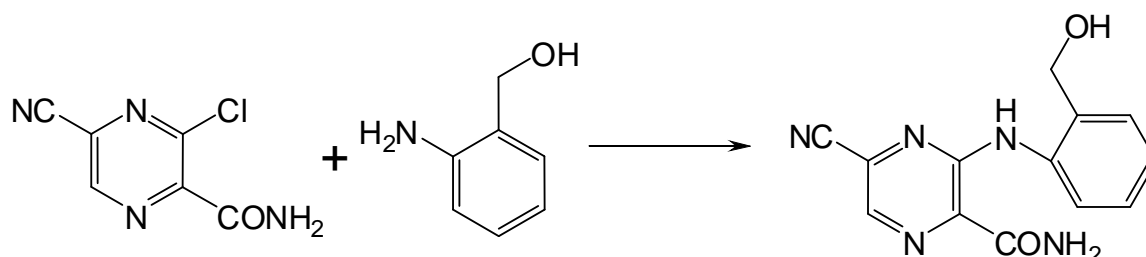
Elementárna analýza	C	H	N	O
Vypočítaný obsah [%]	57,99	4,12	26,01	11,88
Nameraný obsah [%]	60,69	4,64	25,31	-

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3215, ν (CN) 2242, ν (CO) 1690, ν (benzen. jadro) 1618, ν (pyrazin. kruh) 1463, 1350, 1282, 1195

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 11.16 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, H5), 8.08 (s, 2H, CONH₂), 7.68 (d, 2H, H2', H6'), 7.40 (d, 2H, H3', H5'), 5.78 (s, 1H, OH), 4.69 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 167.2, 156.9, 140.3, 137.1, 136.7, 134.0, 129.0, 128.7, 127.9, 127.9, 121.9, 121.9, 65.01

3.6.7 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid



Výtazok: 40 mg, tj. 16,04 % teoretického výtazku

Sumárny vzorec: C₁₃H₁₁N₅O₂

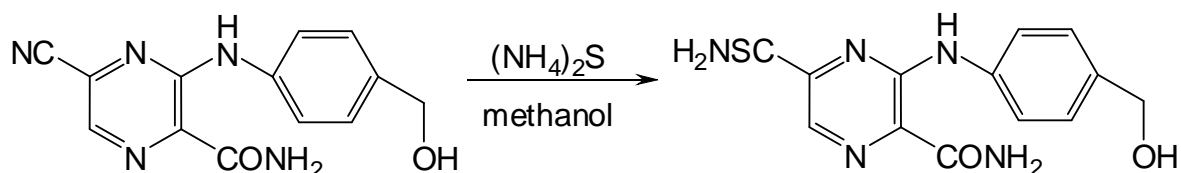
Molárna hmotnosť: 269,26

Teplota topenia: 206 – 208 °C

Elementárna analýza	C	H	N	O
Vypočítaný obsah [%]	57,99	4,12	26,01	11,88
Nameraný obsah [%]	59,35	4,27	25,20	-

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3215, ν (CN) 2236, ν (CO) 1698, ν (benzen. jadro) 1617, ν (pyrazin. kruh) 1494, 1443, 1271, 1203

3.6.8 Príprava 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazin-2-karboxamid



Výtazok: 46 mg, tj. 18,45 % teoretického výtazku

Sumárny vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Molárna hmotnosť: 303,34

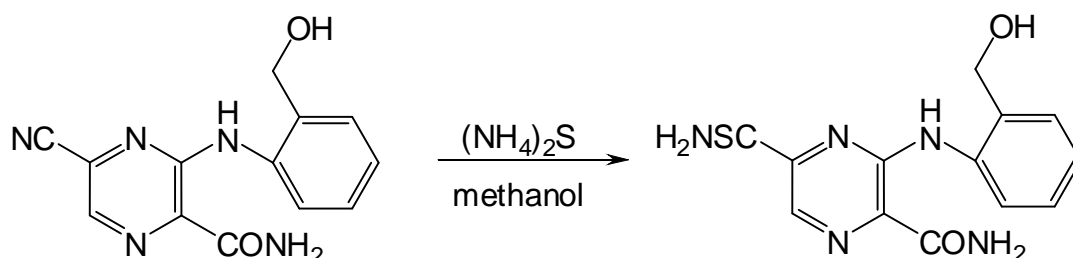
Teplota topenia: 203 – 205 °C za rozkladu

Elementárna analýza	C	H	N	O	S
Vypočítaný obsah [%]	51,47	4,32	23,09	10,55	10,57
Nameraný obsah [%]	52,18	4,16	21,97	-	10,31

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3210, ν (CN) 2242, ν (CO) 1685, ν (benzen. jadro) 1607, ν (pyrazin. kruh) 1458, 1353, 1282, 1191

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 10.78 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, H5), 8.80 (s, 2H, CONH_2), 7.22 (m, 1H, H5'), 7.18 (m, 1H, H3'), 7.06 (m, 1H, H4'), 6.85 (m, 1H, H6'), 5.67 (s, 1H, OH), 4.11 (s, 2H, CH_2), 2.0 (s, 1H, CSNH_2)

3.6.9 Príprava 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazin-2-karboxamid



Výtazok: 47 mg, tj. 18,85 % teoretického výtazku

Sumárny vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

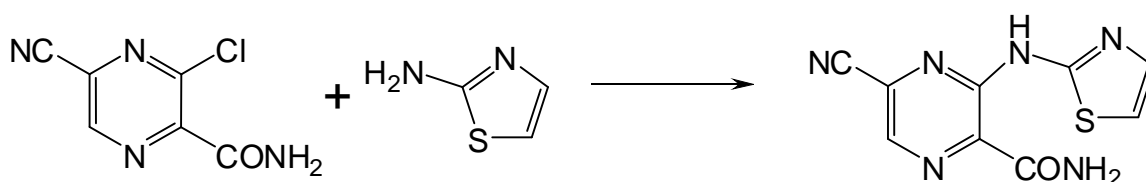
Molárna hmotnosť: 303,34

Teplota topenia: 227 - 229 °C za rozkladu

Elementárna analýza	C	H	N	O	S
Vypočítaný obsah [%]	51,47	4,32	23,09	10,55	10,57
Nameraný obsah [%]	52,38	4,26	21,77	-	10,23

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3215, ν (CN) 2236, ν (CO) 1705, ν (benzen. jadro) 1609, ν (pyrazin. kruh) 1487, 1443, 1271, 1202

3.6.10 Příprava 3-(2-thiazolo)-5-kyanpyrazín-2-karboxamid



Výtěžok: 96 mg, tj. 47,44 % teoretického výtěžku

Sumárny vzorec: C₉H₆N₆OS

Molárna hmotnosť: 246,25

Teplota topenia: 172 - 174 °C

Elementárna analýza	C	H	N	O	S
Vypočítaný obsah [%]	43,90	2,46	34,13	6,50	13,02
Nameraný obsah [%]	44,22	2,61	33,76	-	12,63

IČ spektrum: ν (NH sek.) 3215, ν (CN) 2230, ν (CO) 1682, ν (benzen. jadro) 1612, ν (pyrazin. kruh) 1446, 1387, 1262, 1109

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ : 9.44 (s, 1H, H5), 8.8 (s, 2H, CONH₂), 7.58 (d, 1H, H3'), 7.07 (d, 1H, H4'), 3.50 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ : 173.8, 164.0, 151.1, 148.0, 146.9, 140.3, 139.9, 119.2, 115.8

4. DISKUSIA

V rámci štúdia potencionálnych antituberkulotík bolo už na katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv pripravených niekoľko skupín látok. Svojou prácou som chcel rozšíriť skupinu testovaných potencionálnych antituberkulotík o niekoľko nových derivátov 5-kyanpyrazín-2-karboxamidu a pyrazín-2,5-dikarbonitrilu. Prevedením nitrilovej skupiny na thioamidovú som pripravil ešte dva deriváty 5-thioamidopyrazín-2-karboxamidu.

Vychádzal som z 5-kyanpyrazín-2-karboxamidu podľa schémy v kapitole 3.6.1. Medziprodukty boli pripravené podľa osvedčených postupov a ich čistota overená chromatograficky (TLC) a stanovením teploty topenia. Finálne produkty boli pripravené nukleofilnou substitúciou aromatických amínov na pyrazínovom jadre couplingovou metódou. Až na výnimky neboli dosahované výťažky vyššie ako 20 %. V jednom prípade (3.6.5) bol výťažok 75,74 %. Čistota finálnych produktov bola výsledkom opakovanej kryštalizácie zo sústavy voda/ethanol, alebo flash chromatografiou s mobilnou fázou hexan/ethylacetát (0-20%).

Štruktúra finálnych produktov bola potvrdená IČ spektroskopiou, elementárnou analýzou a u niektorých látok aj NMR analýzou. U výsledných produktov bola pomocou počítačového programu Chemoffice Ultra ver. 1.10 zisťovaná ich lipofilita, charakterizovaná Log *P* a CLogP. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2: Vypočítaná lipofilita v sérii študovaných látok.

Látka	R	CLogP	log P
1	3.6.1	0,658226	1,88
2	3.6.2	0,658226	1,88
3	3.6.3	3,02276	4,3
4	3.6.4	2,04592	1,61
5	3.6.5	2,74845	2,16
6	3.6.6	0,842917	0,75
7	3.6.7	0,842917	0,75
8	3.6.8	1,73563	0,19
9	3.6.9	1,73563	0,19
10	3.6.10	0,279593	1,05

5. ZÁVER

V rámci diplomovej práce som pripravil 10 zlúčenín, ktoré by mohli vykazovať antituberkulotickú aktivitu. Tieto látky neboli doposiaľ popísané v literatúre.

- 3.6.1 3-(2-hydroxymethylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitril
- 3.6.2 3-(4-hydroxymethylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitril
- 3.6.3 3-(3-íodo-4-methylfenylamino)- pyrazín-2,5-dikarbonitril
- 3.6.4 3-(4-N,N-dimethylamino-fenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamid
- 3.6.5 3-(4-brómfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamid
- 3.6.6 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamid
- 3.6.7 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-kyanpyrazín-2-karboxamid
- 3.6.8 3-(4-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazín-2-karboxamid
- 3.6.9 3-(2-hydroxymethylfenylamino)-5-thioamidopyrazín-2-karboxamid
- 3.6.10 3-(2-thiazolo)-5-thioamidopyrazín-2-karboxamid

Produkty sú charakterizované teplotou topenia, CHN analýzou, IČ spektrami a mierou lipofility vyjadrenou hodnotami Log P a CLogP. U piatich látok bolo možné interpretovať ^1H NMR a ^{13}C NMR spektrum, u jednej len ^1H NMR spektrum. Tri látky boli v júni 2006 zaslané na antituberkulotické testy, zatiaľ bez výsledku. Štúdiom antituberkulotickej aktivity a vzťahov medzi štruktúrou a antituberkulotickým účinkom sa budem ďalej zaoberať na postgraduálnom štúdiu.

6. Zoznam použitej literatúry

1. TRIPATHI R.P., TEWARI N., DWIVEDI N., TIWARI V.K.: Med. Res. Rev., 2005, **25**, 93.
2. [15. máj 2007] <http://www.cnn.com/HEALTH/library/DS/00372.html>
3. NIEMANN S., RICHTER E., RÜSCH-GERDES S.: Journal of clinical microbiology, 2000, **38**, 152
4. KOLATTUKUDY P.E., FERNANDES N.D., AZAD A.K., FITZMAURICE A.M., SIRKOVA T. D.: Molecular Mikrobiology, 1997, **24**, 263
5. PEŘINOVÁ J.: Tuberkulóza. Solutio 2000/2001, 65
6. [15. máj 2007] Světová zdravotnická organizace. <http://www.who.cz>
7. [15. máj 2007] http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000600001&script=sci_arttext
8. BUCHTA V., JÍLEK P., HORÁČEK J., HORÁK V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1998, 113
9. [15. máj 2007] <http://www.pneumologie.cz/odborne/doc/Standard-TBC-deti.pdf>
10. SWEANY H. C., TURNER G. C., LICHTENSTEIN M., ENTIN S.: Chest, 1949, **16**, 633
11. EPSTEIN I. G., NAIR K.G.S., BOYD L. J.: Chest, 1956, **29**, 241
12. SOMOSKOVI A., WADE M. M., ZHONGHE SUN, YING ZHANG: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, **53**, 192
13. YING ZHANG, WADE M. M., SCORPIO A., HAO ZHANG, ZHONGHE SUN: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, **52**, 790
14. MITCHISON D. A.: Cas. Lek. Cesk., 1984, **123**, 145
15. [15. máj 2007]. <http://www.taacf.org>
16. PRATT Y.T.: Pyrazines and Piperazines, In: ELDERFIELD R.C.: Heterocyclic Compounds, 1957, **6**
17. POŽARSKIJ A.F.: Chim. Geterocicl. Sojedin., 1985, **7**, 867
18. TAKAHI Y., YASATA Y., WATANABE T.: Acta crystallogr., 1960, **13**, 693
19. KLEIN B., HETMAN N.E., O'DONNELL M.E.: J. Org. Chem., 1960, **28**, 1682
20. SHINDO H.: Chem. Pharm. Bull., 1960, **8**, 34

-
22. SATO N., FUJI M.: J.Heterocycl.Chem., 1994, **31**, 1177
 23. SATO N.: J. CHEM. RES. SYNOP., 1984, **10**, 318
 24. JAMPÍLEK J., DOLEŽAL M., KUNEŠ J., ŠATÍNSKÝ D., RAICH I.: Current Organic Chemistry, 2005, **9**, 49
 25. ABE Y., SHIGETA Y., UCHIMARU F. a kol.: Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. Japan 1969, **12**, 898
 26. KUSHNER S., DALALIAN H., BACH F.L. a kol. : J. Am. Chem. Soc. 1955, **77**, 1152
 27. FOKS H. : Acta Pol. Pharm., 1976, **33**, 153
 28. GARDINI G.P., MINISCI F., PALLA G., ARNONE A., GALLI R.: Homolytic amidation of heteroaromatic bases a new selective process. Tetrahedron lett., 1971, 59
 29. DLABAL K., PALÁT K., LYČKA A., ODLEROVÁ Ž.: Coll. Czech. Chem. Com., 1990, **55**, 2493
 30. KARMAS G., SPOERRI P.E.: J. Am. Chem. Soc., 1957, **79**, 680
 31. NOVÁČEK L. PALÁT K., ČELADNÍK M.: Chem. Listy, 1963 **57**, 299
 32. ČERVINKA O. a kol.: Chemie organických sloučenin, 1. díl., 1. vydanie, SNTL, Praha 1985, 669
 33. DOLEŽAL M. , HARTL J. , LYČKA A. , BUCHTA V. , ODLEROVÁ Ž.: Coll. Czech. Chem. Com., 1995, **60**, 1236
 34. BANKS C.K.: J.Am.Chem.Soc., 1944, **66**, 1127
 35. FOKS H., MANOWSKA W.: Acta Poll. Pharm., 1976, **33**, 55
 36. HARTL J., DOLEŽAL M., KRINKOVA J. a kol.: Coll. Czech. Chem. Com., 1996, **61**, 1109
 37. [15. máj 2007] PALEK L.: Osobná informácia