UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.

Hradec Králové, 2008 Petra Plasová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, http://www.faf.cuni.cz
tel. +420495067111, fax +420495518002

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: **farmaceutické chemie a kontroly léčiv**	Na akademický rok: 2007/2008

Jméno příjmení: **Petra PLASOVÁ**

Studijní program: **farmacie**

Vedoucí diplomové práce: **doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.**

Název diplomové práce:
Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.

Název diplomové práce v angličtině:
Pyrazine derivatives as potential drugs I.

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je syntetizovat sérii na jádře substituovaných derivátů pyrazinu s předpokládanou antimykobakteriální, resp. antifungální aktivitou.
Studentka nejprve provede literární rešerši, soustředí se na perspektivní látky a na metody přípravy derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny, resp. analogických sloučenin. Těžištěm její činnosti bude syntetická práce.
Dosažené výsledky předloží v písemné podobě. Rozsah a členění práce musí odpovídat zásadám platným pro diplomové práce syntetického zaměření.

Seznam odborné literatury:
Chemical Abstracts (CA) **Beilsteins Handbuch der organischen Chemie** **Houben I., Weyl Th.: Die Methoden der organischen Chemie** **Pharmazeutische Stoffliste** **počítačové databáze (Web of Science, Medline, Beilstein, CA)** **literatura farmaceuticko-chemického charakteru, např. Current Medicinal Chemistry, Eur. J. Med. Chem., Drug Discovery Today, J. Med. Chem., Drugs Fut., Farmaco, Bioorg. Med. Chem. Lett. apod.**

Datum zadání diplomové práce:	**10. listopadu 2006**

Termín odevzdání diplomové práce:	**15. května 2008**

vedoucí katedry

Doc.PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.
děkan fakulty

V Hradci Králové dne: **10. listopadu 2006**

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a veškeré literární prameny a zdroje informací, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

……..

16.5.2008 Petra Plasová

ABSTRAKT

Název diplomové práce: **Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.**

Vypracovala: **Petra Plasová**

Tuberkulóza patří mezi nejrozšířenější infekční onemocnění, kterým je nakažena přibližně třetina světové populace. V rámci studia potenciálních pyrazinových antituberkulotik byla na katedře připravena série typu substituovaných arylaminopyrazinů. Výchozí 3-chlorovaný pyrazinový derivát poskytl couplingem (aminodehalogenací) s aromatickými aminy požadované sloučeniny. Modifikace struktury spočívala v obměňování karboxylových funkčních skupin, např. v dehydrogenaci karboxamidu (vznik karbonitrilu) či v adici monosulfanu (vznik karbothioamidů). Osm v chemické literatuře dosud nepopsaných látek bylo charakterizováno teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ, ^{1}H a ^{13}C NMR spektry a hodnotami log *P*. Látky se podrobují *in vitro* hodnocení na účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, USA), avšak výsledky nejsou dosud známé. Připravené sloučeniny byly otestovány *in vitro* na antifungální aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody proti vybraným houbovým patogenům na Katedře biologických a lékařských věd a na antimykobakteriální aktivitu na čtyřech kmenech ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

KLÍČOVÁ SLOVA: Pyrazin; Lipofilita; Antimykobakteriální a antifungální screeninq.

ABSTRACT

Title of diploma thesis: **Pyrazine dervatives as potential drugs I.**

Presented by: **Petra Plasová**

Tuberculosis belongs between wide-world spreaded infections diseases, by which is infected about one third of human population. Due to attempts with potencial pyrazine antituberculotics at our department of Pharmaceutical Chemistry were developed series of substituted arylaminopyrazines. The first one, 3-chloropyrazine derivate, provided via coupling (aminodehalogenation) with aromatic amine acquired compounds.Structure modifications was achived by changing of carboxylic functions groups, e.g. dehydrogenation of carboxamide (origin of carbonitrile) or by adition of monosulphane (originates carbothioamide). We gained 8 absolutely new substances, which have not been described before, so they were characterized by TLC, melting point, elementary analysis, IR, ^{1}H,^{13}C NMR spectrum and log P values. These new substances are under the testing in vitro of their activity, against Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Rv$ under international research program for new antituberculotics testing (TAACF, USA), resultes are not known yet. Mentioned compounds were in vitro tested for antifungal activity against determine fungal pathogens on Departement of biological and medicinal sciencis and against four tribes of mycobacteria in Hospital of Hradec Kralove.

KEY WORDS: Pyrazine, Lipofility, Antimycobacterial and antifungal screening

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu práce **doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.** za cenné odborné rady, profesionální a osobní přístup při zpracovávání mé diplomové práce.

……..

V Hradci Králové 16.5.2008 Petra Plasová

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

T_t … teplota tání
TLC…tenkovrstvá kapalinová chromatografie
IČ…infračervené spektrum
^{1}H a ^{13}C NMR…^{1}H a ^{13}C nukleární magnetická rezonance
HIV…Human Immunodeficiency Virus, RNA virus
AIDS…Acquired ImmunoDeficiency Syndrome, symptomy HIV infekce objevující se v pozdních fázích
BACTEC…přístroj sloužící k časné detekci mikrobiálího růstu v hemokultuře (detekce je založena na fluorescenčním průkazu tvorby CO_2, který se v hemokultivační nádobce hromadí jako produkt metabolismu bakterií)
PCR…Polymerase Chain Reaction (polymerasová řetězová reakce)
NAD^+
CFU colony-forming units
AT aktivní tuberkulóza
TRN tuberkulóza a respirační nemoci

OBSAH

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE **2**

1 ÚVODNÍ ČÁST **4**

1.1 TBC - HROZBA PRO SOUČASNÝ SVĚT NEBO ZAPOMENUTÁ MINULOST? .. 4
1.2 VÝSKYT TUBERKULÓZY V ČR A VE SVĚTĚ 4
1.2.1 Celosvětová statistika výskytu TBC za rok 2006 5
1.3 TBC – INFEKČNÍ ONEMOCNĚNÍ 7
1.3.1 Mykobakterie 7
1.4 PODOBA TBC 9
1.5 DIAGNOSTIKA TBC 11
1.6 TERAPIE TBC 12
1.6.1 Vakcinace 12
1.6.2 Chemoterapie 13
1.7 ANTITUBERKUKOTIKA 17
1.7.1 Antituberkulotika 1.linie 17
1.7.2 Další antituberkulotika používaná v terapii 23
1.7.3 Potencionální antituberkulotika 28

2 TEORETICKÁ ČÁST **37**

2.1 LÉČIVA NA BÁZI PYRAZINU PŘÍRODNÍHO A SYNTETICKÉHO PŮVODU 37
2.1.1 Pyrazin v přírodních sloučeninách: 38
2.1.2 Pyrazin v syntetických sloučeninách: 38
2.2 VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA 40
2.3 PŘÍPRAVA N-OXIDŮ 41
2.4 HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA 42
2.5 AMIDACE 43
2.6 AMINODEHALOGENACE 44
2.7 PŘÍPRAVA FUNKČNÍCH DERIVÁTŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN 45

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **46**

3.1 PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE 46
3.2 POPIS JEDNOTLIVÝCH SYNTÉZ 47
3.3 NOVĚ PŘIPRAVENÉ DERIVÁTY PYRAZINKARBO-XYLOVÉ KYSELINY 49
3.3.1 3-(5-brom-4-fluor-2-methylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid 49
3.3.2 5-kyan-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid 50
3.3.3 5-kyan-3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid 51
3.3.4 5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid 52
3.3.5 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril 53
3.3.6 3-(3-kyanofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril 54
3.3.7 5-karbamothioyl-3(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid 55
3.3.8 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karbothioamid) 56

4 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ **57**

4.1 ANTITUBERKUKOLICKÁ AKTIVITA 57
4.2 ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA 58

5 DISKUZE **60**

6 ZÁVĚR **64**

LITERATURA **65**

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Již několik let se Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potencionální antituberkulotickou a antimykotickou aktivitou. Tato diplomová práce je dalším dílčím příspěvkem k tomuto výzkumu.

Ve své práci se chci konkrétně zaměřit na:

1. literární rešerši - za pomoci dostupných knižních a časopiseckých (většinou elektronicky prezentovaných) zdrojů bych ráda zodpověděla otázky týkající se šíření a terapie TBC v současném světě.

2. stanovení chemických postupů syntéz derivátů pyrazinu na základě studia odborné literatury a současných výzkumných výsledků mého školitele.

3. samotnou syntézu sloučenin, které ještě nejsou popsány v odborném tisku.

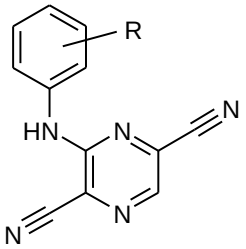
4. vypočtení log *P* (lipofility) nových sloučenin a zjištění vlivu struktury na log *P*.

5. provedení biologických testů a jejich vyhodnocení za pomoci kolegů, jež provádějí testování na FaF UK HK Katedra biologických a lékařských věd.

6. Charakterizaci sloučenin zjištěním Tt, TLC, IČ, ^{1}H, ^{13}C NMR spekter a elementární analýzy.

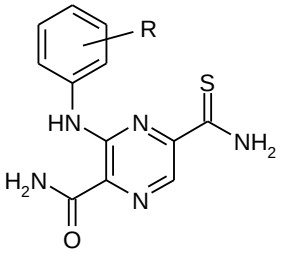
7. Určení vztahu mezi strukturou, biologickým účinkem (antimykobakteriální a antifungální aktivita) a lipofilitou ve sérii připravených sloučenin.

Obecné vzorce nasyntetizovaných sloučenin



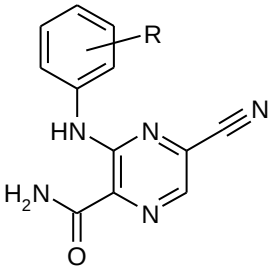
3-arylaminopyrazin-2,5-dikarbonitril

R= 3-C≡N
3-C≡CH



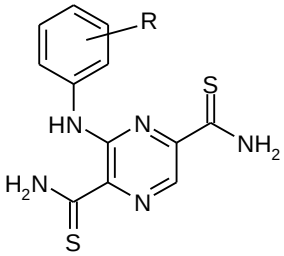
3-arylamino-5-thiokarbamoylpyrazin-2-karboxamid

R= 3-C≡CH



3-arylamino-5-kyanpyrazin-2-karboxamid

R= 2-CH_3, 4-F, 5-Br
3-I, 4-CH_3
3-C≡N
3-C≡CH



3- arylaminopyrazin-2,5-dithiokarboxamid

R= 3-C≡CH

1 ÚVODNÍ ČÁST

1.1 TBC - HROZBA PRO SOUČASNÝ SVĚT NEBO ZAPOMENUTÁ MINULOST?

Tuberkulóza neohrožuje jen tzv. rozvojový svět, ale stále více i ekonomicky vyspělé země. Světová zdravotnická organizace (WHO) „bije na poplach“ a vyzývá vlády všech států, aby urychleně připravily akce proti TBC. Strach ze smrtelné nemoci není neodůvodněný, neboť bakterií TBC se dosud nakazila třetina obyvatel naší planety. Tuberkulóza se stává častější příčinou úmrtí lidí než AIDS?! [1]

1.2 VÝSKYT TUBERKULÓZY V ČR A VE SVĚTĚ

TBC je specifické zánětlivé onemocnění, jehož historie sahá až do historie starověkého Egypta. Do 1. poloviny 20. století bylo toto onemocnění považováno za nejrozšířenější celosvětovou epidemii. V roce 1946 byl zaznamenán prudký vzestup počtu onemocněných TBC. V této době to byl jeden z nejtíživějších problémů téměř v celé poválečné Evropě, a to hlavně u populace dětí a mládeže, jejichž organizmus se nestihl vyrovnat s nedostatkem potravy během 2. světové války a po ní.
7. 4. 1948 vznikla v Ženevě Světová zdravotnická organizace, která se snažila zmírnit tehdejší tíživou situaci.

Statistická data z různých částí světa se velmi liší. Ekonomicky vyspělé země vykazují nízkou incidenci a nízkou mortalitu nakažených TBC oproti zemím tzv. třetího světa [2]. Pomyslným spojencem mykobakterií v těchto zemích je oslabený imunitní systém obyvatel související se zvýšeným výskytem HIV pozitivity, bída, nedostatek potravin a podvýživa. Na celém světě dnes sužuje přes 30 milionů lidí aktivní onemocnění TBC. Ročně zemřou přes 3 miliony nakažených. Celá třetina světové populace v sobě hostí bakterie TBC [1].

Třetina obyvatel světa žije v hospodářsky vyspělých státech, tedy v příznivých materiálních a společenských poměrech. Incidence TBC je v těchto zemích již řadu let velmi nízká. Proto bylo v devadesátých letech minulého století velikým překvapením, že

ani v jedné z těchto ekonomicky silných zemí nedošlo k vymýcení TBC, jak se předpokládalo z trendů incidence tohoto onemocnění ze sedmdesátých a osmdesátých let. Zjistilo se, že ve všech částech světa existují nemalé skupiny obyvatel, které lze zahrnout pod pojem rizikové skupiny, a to díky snížené imunitě buněčného typu, pro vysoký věk, pro závažná onemocnění (např. AIDS), pro léčbu imunosupresivy, cytostatiky, zářením nebo také díky svízelné sociální situaci lidí (např. narkomani, bezdomovci, alkoholici, přistěhovalci z třetího světa) [2], [3], [4].

1.2.1 Celosvětová statistika výskytu TBC za rok 2006
(z výroční zprávy Světové zdravotnické organizace)

Ačkoli byl v roce 2006 procentuální výskyt onemocnění TBC nižší než v roce 2005, reálný počet nakažených jedinců meziročně vzrostl díky nárůstu počtu obyvatelstva ve světě. Ideální míra poklesu výskytu TBC by podle WHO měla být 5-7 % ročně. Organizaci znepokojuje skutečnost, že rychleji než kdy v historii rostl výskyt forem TBC rezistentních ke všem antituberkulotikům. Tato skutečnost je zapříčiněna také stále vyšším růstem HIV pozitivních jedinců, především v zemích třetího světa. Uvádí se, že za rok 2006 přibylo něco kolem 709 000 nových případů TBC ve spojení s HIV infekcí.

Statistické údaje pro rok 2006:
Počet mrtvých – 1,7 milionu, z toho 230 000 s HIV infekcí
Počet osob trpících TBC nákazou – 14,4 milionu
Nové případy – 9,2 milionu včetně 700 000 TBC s HIV infekcí

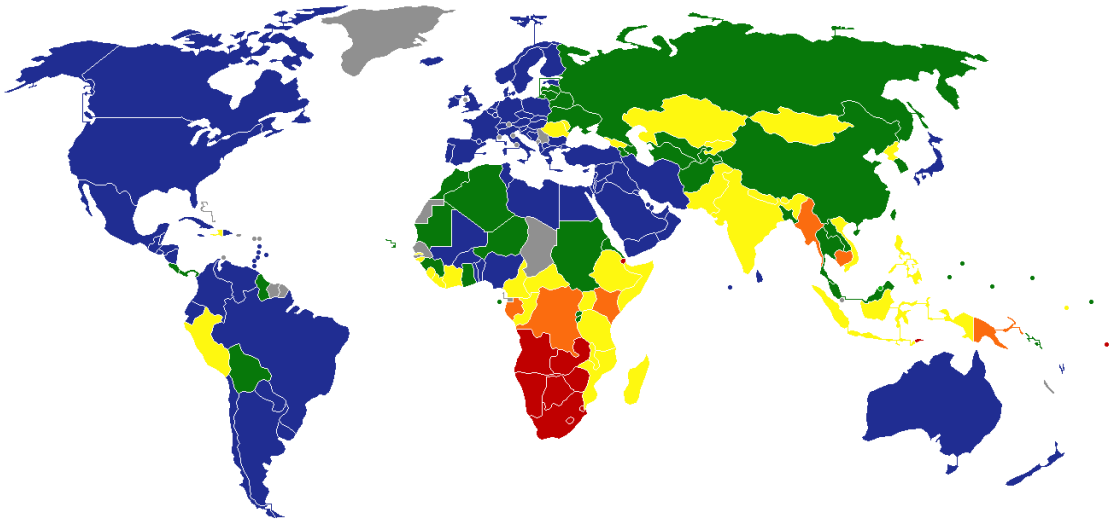
Úmrtnost v roce 2006 oproti roku 2005 poklesla o 2,6 %.
Nejvyšší výskyt TBC: Afrika, Asie, Indie, Čína, Indonésie, Jižní Afrika, Nigérie.

Celkový počet onemocnění v Evropě je stabilní oproti situaci v rozvojových zemích. WHO ve své výroční zprávě o tuberkulóze konstatuje, že doufala ve větší pokles míry výskytu choroby, než k jakému ve skutečnosti v roce 2006 došlo. A to vzhledem k pokroku ve zlomovém roce 2005, kdy se míra výskytu choroby poprvé po mnoha letech

snížila. Uvádí rovněž, že celosvětová míra výskytu nových případů TBC byla v roce 2006 nižší, než byl průměr výskytu mezi lety 2001 až 2005.

Pro Českou republiku jsou údaje za rok 2006 celkem příznivé. Mortalita je v ČR velmi nízká, 0,5/100 000 obyvatel. Nahlášeno bylo 973 případů onemocnění TBC. Statistika údajů za rok 2007 není zatím známa, ale podle Národní jednotky dohledu pro TBC lze očekávat další pokles počtu případů nákazy. Avšak i u nás roste výskyt nemoci AIDS, které představuje vyšší riziko nákazy tuberkulózou. [5], [6], [7]

Epidemiologická situace je závažná v zemích jihovýchodní Asie, subsaharské Afriky a ve východní Evropě. V těchto zemích se špatnými socioekonomickými podmínkami pro život často selhává kontrola a dohled nad TBC, dále nad prevencí a vakcinací proti tomuto onemocnění.

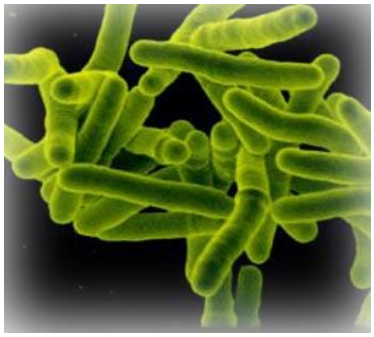


Vysvětlivky: Incidence TBC ve světě. červená = > 300 000, oranžová = 200 000–300 000; žlutá = 100 000–200 000; zelená = 50 000–100 000; modrá = < 50 000 a šedá = neuvedeno. Data pochází z WHO, 2006.

1.3 TBC – INFEKČNÍ ONEMOCNĚNÍ

Tuberkulóza (TBC) je celkové chronické infekční onemocnění, které je řazeno mezi specifické zánětlivé procesy. Hlavním původcem onemocnění je *Mycobacterium tuberculosis,* kterou v roce 1882 z plicního tuberkulu izoloval německý bakteriolog Robert Koch (1843- 1910) [1], [8], [9]. Vyvolavatelem tuberkulózy u lidí je především *M. tuberculosis* [10], [11]. Existují však i další mykobakterie – „*mycobacteria other than tuberculosis*“ (tzv. MOTT) , které se řadí mezi atypické mykobakterie. Mohou vyvolat závažné procesy u imunodeficientních stavů (AIDS). Jsou to: *M. avium - intracellulare, M. africanum, M. bovis* (kromě *M. bovis* BCG) a *M. microti* [10], [12].

1.3.1 Mykobakterie



M. tuberculosis

Jsou to aerobní acidorezistentní tyčky, které se běžně vyskytují v lidském okolí jako saprofyté [10]. Od ostatních organizmů se odlišují silnou buněčnou stěnou, která obsahuje velký podíl lipidních látek (tuků a vosků), pomoci kterých mají hydrofóbní charakter [4]. Nebarví se ve vodě rozpustnými barvivy (dle Granea), lépe se barví koncentrovanými barvivy (metoda dle Ziehla – Neelsena), případně s použitím tepla. Takto obarvíme prakticky vše v preparátu, ostatní složky, včetně bakterií neacidorezistentních, se odbarví v kyselém prostředí [10].

Pomnožují se pomalu (48 hodin je generační doba), pro své růstové nároky na běžných kultivačních půdách nerostou, viditelné kolonie se dají rozeznat až po několika týdnech pěstování na speciálních půdách [4], [10].

Kromě obvyklých složek buněčné stěny, mezi které se řadí lipidová dvojvrstva a peptidoglykan, obsahuje jejich buněčná stěna navíc vrstvu tvořenou dalšími

polysacharidy, acyllipidy a mykolovými kyselinami, které jsou kovalentně spojeny s arabinogalaktany a tvoří mykobakteriální silnostěnný komplex. Ten znesnadňuje průnik léčiva do mykobakterie a léčba TBC je tak velmi obtížná [8]. Vlivem lipidů ve stěně mykobakterií vznikají ohraničená ložiska – tuberkuly.

Toto onemocnění se projevuje ve dvou morfologických typech:

a) tuberkulózní uzlík - produktivní forma zánětu

b) tuberkulózní exudát - exudativní forma zánětu [2]

Ad A)

- mikroskopických rozměrů
- v centru ložiska kazeifikační nekrózy a kolem nich jsou epiteloidní buňky
- Langhansovy buňky (mnohojaderné buňky s při obvodu seřazenými jádry)
- množství lymfocytů a plazmatických buněk
- časem zjizevnatí (nárůst vaziva; kalcifikace) a propadnou kazeifikační nekróze [13]

Ad B)

- na začátku vznikají ložiska serofibrinózního zánětu
- exudát se vyskytuje na slizničních a serózních blanách a propadá „zesýrovatění“- kazeifikační nekróze [13]

Nejčastějším přenosem infekce je nemocný člověk, který kašle, kýchá, nebo jen hovoří a díky kapénkovému přenosu se mykobakterie šíří dále do okolí. Následky tuberkulózní infekce pro organizmus závisí na množství a virulenci mykobakterií, na opakovaném styku s infekčním zdrojem a na stavu imunitního systému infikovaného jedince [9], [11]. Při styku s infekcí může organizmus reagovat trojím způsobem:

- organizmus není infikován
- organizmus je infikován, ale nedochází k manifestnímu onemocnění
- vzniká manifestní onemocnění, důvodem muže být velké množství a vysoká virulence bakterií i nedostatečná imunita [4]

1.4 PODOBA TBC

Manifestní onemocnění

1. Primární TBC

Toto onemocnění vzniká při prvním styku organizmu s tuberkulózní infekcí. Jeho základním znakem je postižení regionálních dutin, které odpovídají místu průniku infekce do jedince. Je nejčastější v dětském věku, protože hlavně děti se setkávají s infekcí poprvé. U dětí je vývoj onemocnění celkem příznivý, bez přechodu k rozpadům a s tendencí ke spontánnímu hojení. Onemocnění se může projevovat zvýšenou teplotou, nechutenstvím, snížením celkové aktivity. V případě dospělých se jedná o tzv. pozdní primoinfekci. Uzlinová složka nebývá tak výrazná a onemocnění má od počátku tendenci k progresi, rozpadům a k bronchogenním rozptylům [4].

2. Postprimární TBC

Tato forma onemocnění vzniká u osob, které prodělaly primární tuberkulózu. Může vznikat přímým přechodem z primární formy nebo endogenní reaktivací starého kalcifikovaného primárního ložiska obsahujícího mykobakterie při oslabení imunity. Další možností je nová exogenní superinfekce. Podle časového odstupu mezi primární a postprimární TBC se rozlišuje časná a pozdní postprimární forma. Časné postprimární formy onemocnění vznikají do 1 roku po infekci. Patří mezi ně tuberkulózní meningitida, meningoencefalitida, akutní militární TBC a exudativní pleuritida. Pozdní postprimární formy postihují kosti a klouby 1 až 2 roky po primoinfekci. V časovém odstupu 3 let od primoinfekce mohou být postiženy močové cesty a genitální systém a za 10 a více let po primoinfekcí ledviny. Infekce může začít bez výraznějších příznaků. Nebo se mohou plíživě vyskytnout necharakteristické příznaky, které většina pacientů léčí jako chřipkové onemocnění. Při těžkém průběhu je přítomna teplota, noční pocení, kašel s expektorací, vytvoření pleurálního výpotku, nodózní erytém [4].

TBC má mnoho podob

80-85 % TBC dýchacího ústrojí

15-20 % mimoplicní TBC

- TBC periferních uzlin

Vedle plic se jedná o nejčastější postižení, které zasahuje hlavně krční uzliny. Projevem této formy onemocnění je mimo jiné nebolestivé zduření.

- Tuberkulózní zánět orofaciální oblasti

V ústní dutině je vzácností výskyt této choroby jako primární. Objevuje se u člověka, který se s TBC ještě nesetkal (např. u kojenců, batolat nebo dětí předškolního věku). Jinak jde většinou o sekundární projevy, které jsou vyvolány zachycením mykobakterií z jiného (např. plicního) ložiska.

- TBC kůže a podkoží

Toto onemocnění pochází většinou z lymfatických uzlin, kloubů nebo z infikovaných slizničních TBC vředů v ústech.

- Urogenitální TBC

Jedná se o sekundární postižení, které se objevuje u čtvrtiny případů.

- TBC střev

Toto onemocnění se vzácně projevuje u rozsáhlé plicní formy TBC. [1]

1.5 DIAGNOSTIKA TBC

M. tuberculosis ve sputu

Při diagnostice TBC se využívají následující metody:

1) průkaz tuberkulózního mykobakteria mikroskopicky nebo kultivačně z jakéhokoliv biologického materiálu (ze sputa, likvoru, moči, pleurálního výpotku apod.)

2) průkaz tuberkulózního uzlíku nebo exudátu histologickým vyšetřením z kteréhokoliv orgánu lidského těla

3) průkaz z rentgenového vyšetření plic (popř. dalších orgánů)

4) tuberkulinový test – tuberkulin je očištěná bílkovina z bakterií způsobující TBC. Tuberkulin se vstřikuje do kůže a následně se posuzuje reakce (tubekulinová zkouška, zkouška dle Mantouxa). Tyto zkoušky umožňují zjistit, zda se nemocný setkal s TBC, a to včetně očkování (popř. lze zjistit buněčnou imunitu). Tato metoda je pouze orientační.

5) pomocné vyšetřovací metody – bronchoskopie, bronchografie, hrudní punkce, mediastinoskopie, počítačová tomografie a sonografie.

6) pomocné laboratorní vyšetření – PCR, genetické sondy, BACTEC, vyšetření krve a moči. [4], [9], [12], [14]

1.6 TERAPIE TBC

Po stanovení diagnózy musí být každý pacient léčen po dobu několika týdnů na lůžkovém oddělení plicní kliniky nebo ve specializované léčebně na plicní onemocnění a terapii TBC. Od objevení TBC se postupně začaly používat 2 základní přístupy pro získání kontroly nad tímto onemocněním:

1) vakcinace

2) chemoterapie

1.6.1 Vakcinace

Tato metoda slouží jako prevence onemocnění. Proti všem bakteriím existuje jenom 1 vakcína založená na *Mycobacterium bovis.* Očkovací látku (BCG = avirulentní Bacil Calmete Guerin) tvoří lyofilizát bakteriálních zárodků Mycobacteria bovis, které se získávají pomnožením vhodného atenuovaného vakcinačního kmene na umělém kultivačním médiu.

V roce 1908 provedl Calmette a Guerin v Pasteurově Institutu sérii 230ti pasáží virulentní Mycobacteria bovis. Výsledná kultura byla stabilní vůči reverzi virulence a zachovávala si omezenou invazivnost. První lidské očkování s tímto atenuovaným kmenem bylo provedeno v roce 1921 v Paříži. V současnosti se nejčastěji používají 4 kmeny, a to Pasteur – 1173 P2; Tokio – 172; Copenhagen – 1331 a Glaxo – 1077.

V ČR se užívá hlavně tzv. silný kmen dánský (Copenhagen – 1331) a francouzský (Pasteur – 1173 P2). Primární imunizace se provádí podáním jedné vakcinační dávky BCG vakcíny nejdříve 4 dny po porodu do 6ti týdnů života novorozence a pro imunizaci všech osob, které jsou tuberkulín negativní a mohou vystaveny zvýšenému výskytu této nákazy. Boosterující (posilující) imunizace se provádí tehdy, byl-li zjištěn negativní výsledek tuberkulinové zkoušky. Tato zkouška se povinně provádí zpravidla ve 2. a 3. roce po dokončení ostatních základních očkování a případně v 11. roce u těch dětí, u nichž nebyla prokazatelně vytvořena jizvička po očkování v novorozeneckém věku se provede revakcinace. V ČR je očkování proti TBC povinné od roku 1994 a řídí se příslušnými vyhláškami. Experimentální studie ukázaly, že mechanizmus účinku BCG očkování spočívá v redukci hematogenního šíření bacilů z místa primární infekce zprostředkované paměťovými T lymfocyty vyvolané po první expozici BCG. Tím lze

zabránit především vzniku generalizovaných forem. Předpokládá se, že vakcína vyvolá imunitu, která zabraňuje přechodu následujících infekci do onemocnění [4], [11], [15].

1.6.2 Chemoterapie

Po objevení původce onemocnění bylo cílem objevit účinné léčebné prostředky. Obratem se v této oblasti stalo na konci 2. světové války objevení třech antituberkulotik, a to v krátkém časovém sledu (1944 streptomycin; 1946 kyselina paraaminosalicylová; 1952 využití antimykobakteriálního účinku hydrazidu kyseliny isonikotinové). Počátek účinné antituberkulotické léčby se datuje od padesátých let minulého století. Postupně byly formulovány principy používání těchto látek (podávání v kombinaci, rozlišení fáze léčby) včetně principů vyhledávání onemocnělých.

Nedostatečná znalost biochemických pochodů mykobakterií a mechanizmu účinku léčiv vedla k rozsáhlému screeningu celých knihoven sloučenin, které jsou potřebné proti tak závažnému onemocnění, jakým je právě TBC. Cílem antituberkuloticky účinných léčiv jsou biochemické pochody, kterými jsou syntetizovány makromolekuly - bílkoviny (streptomycin), nukleové kyseliny (PAS) a nebo biopolymery buněčné stěny. DNA-topoizomeraza a isocitrátlyasa jsou důležité enzymy mykobakterií, které představují další důležité místo zásahu nových antituberkulotik.

Moderní strategie léčby TBC byla vypracována WHO v 90. letech minulého století a je celosvětově zaváděna do praxe. Spočívá ve standardizovaných krátkodobých chemoterapeutických režimech aplikovaných za individuální péče o každého nemocného (tzv. DOTS= Directly Observed Treatment Short – course). Účinný TBC program, kterým by byla snížena nemocnost, má vyléčit alespoň 85 % nemocných. DOTS je hlavně určen pro rozvojové státy s vysokým výskytem TBC. Základem léčby zůstávají po léta používaná léčiva s baktericidními (usmrcující dělící se bakterie) a sterilizačními vlastnostmi (zabíjejí persistory), se schopností zabránit vzniku rezistence.

Zásady léčby antituberkulotiky:

- léčiva se podávají v kombinaci (zabránění lékové rezistenci)
- léčiva se podávají v jedné denní dávce (dát prostor mykobakteriím se pomnožit a pak zasáhnout jednou dávkou, která dosáhne vysoké hladiny)
- dlouhodobé podávání léčiv

Důležité je zdůrazňování pravidelného užívání léků – tzv. compliance. Běžný léčebný režim je rozdělen na 2 fáze – iniciální a pokračovací. Iniciální fáze trvá běžně 2 měsíce a probíhá za hospitalizace a pokračovací fáze (obvykle ambulantní) následuje po fázi iniciální a trvá 4-6 měsíců [4].

Podle lokalizace, rozsahu onemocnění a zejména podle bakteriologického nálezu, dále podle předchozí léčby AT, přidružených onemocnění a případných kontraindikací zařadí lékař oboru TRN nemocného do léčebné kategorie a určí lékový režim.

TBC nemocní jsou léčeni v jedné z následujících kategorií AT léčby:		
I. kategorie	nová onemocnění plicní TBC mikroskopicky pozitivní a nemocní s klinicky závažnými formami plicní a mimoplicní TBC (téměř všechny bakteriologicky ověření TBC)	
II. kategorie	recidivy, léčebné neúspěchy, léčby po přerušení	
III. kategorie	méně závažné formy bakteriologicky neověřené plicní a mimoplicní TBC	
IV. kategorie	ostatní – TBC chronici, kteří zůstávají bakteriologicky pozitivní i po dokončení kontrolované léčby doporučované pro kategorii II	
Doporučované režimy podle kategorií		
	Iniciální fáze	Pokračovací fáze
I. kategorie	2 HRZE nebo 2 HRZS	4 HR nebo 4 H3R3 nebo 6HE
II. kategorie	2 HRZSE a 1 HRZE, při přetrvávání m.p. 2 HRZSE a 2 HRZE	5 HRE nebo 5 H3R3E3
III. kategorie	2 HRZ nebo 2 H3R3Z3	4 HR nebo 4 H3R3 nebo 6HE
IV. kategorie	léčení přísně individualizované, provádí se ve specializovaných ústavech; u rozsáhlých bakteriologicky závažných procesů se připouští prodloužení léčby v souladu s klinickým stavem	

Seznam zkratek: R= rifampicin; E= ethambutol; m.p.= mikroskopicky pozitivní; H= isoniazid; Z= pyrazinamid; S= streptomycin

[4], [14]

Např: 6 HE = 6 měsíců denního podávání HE

5 H3R3E3 = 5 měsíců intermitentního podávání HRE 3x týdně

Aby se předešlo riziku vzniku lékové rezistence nesprávným podáváním antituberkulotik, jsou léčiva přímo kontrolována v jednorázové aplikaci, tím se také sníží dávky jednotlivých léčiv a riziko výskytu nežádoucích či toxických účinků. Po zjištění TBC a jeho bakteriálního ověření se provádí tzv. identifikace vyvolávajícího kmene s následným testem citlivosti na podaná antituberkulotika první linie. Pokud se zjistí rezistence kmene na jedno ze základních antituberkulotik, hovoří se o monorezistenci. Při rezistenci na více léčiv, kromě isoniazidu a rifampicinu se jedná o polyrezistenci. V těchto případech je léčba převedena na antituberkulotika 1. linie se zachovalou citlivostí a případně rozšířena o citlivá antibiotika (markolidová, aminoglykosidová ATB).

Velkým problémem dnešní doby jsou MDR-TB (Multi Drug Resistance Tuberculosis) a XDR-TB (Extensively Drug Resistance Tuberculosis).

MDR-TB je charakterizována jako rezistence vyvolavatele TBC (Mycobacterium tuberculosis) k minimálně dvěma účinným léčivům 1. linie – isoniazidu a rifampicinu. XDR – TB je ještě složitější formou TBC. Jedná se o kmeny rezistentní jak k léčivům 1. linie isoniazidu a rifampicinu, tak k 3-6 zástupcům 2. linie léčiv - kanamycinu, kapreomycinu, amikacinu (injekčně podávané), chinolonům, cykloserin, thioamidům a kyselině paraaminosalicylové.

Principy léčby MDR-TB a XDR-TB jsou stejné. Rozdíl je ale v tom, že XDR-TB je spojena s vyšším procentem úmrtí. Epidemiologie XDR-TB není v současnosti moc dobře sledována, neboť se doufá, že se tak snadno nepřenáší ve zdravé populaci. Snadněji se šíří mezi osobami s HIV nákazou. Tito nemocní také častěji infekci podlehnou. O XDR-TB se začíná mluvit od roku 2006 díky smrtelným případům v jihoafrické vesnici Kwazulu-Natal. Z 53 případů onemocnění TBC 52 osob zemřelo, a to nebyly nikdy předtím léčeny na TBC. V roce 2007 bylo zaznamenáno 314 nakažených, 215 osob z toho nemoci podlehlo. Je zřejmé, že tlak této vlny TBC je spojen hlavně s výskytem HIV, špatnou dostupností léčiv v daných oblastech a se špatnou kontrolou léčiv v rozvojových zemích. Začalo se uvažovat o omezení pohybu lidí z těchto oblastí jako prevence proti šíření vážné formy TBC [16].

„Global response plan“ pro rok 2007-2008 v řešení XDR a MDR tuberkulózy

Pod záštitou Světové zdravotnické organizace (WHO) vznikly 2 plány na řešení špatné situace MDR a XDR-TB. První z nich - „Global response plan 2007- 2008“ má za cíl zachránit během 2 let 134 000 nakažených MDR a XDR-TB.

Druhý - „Global Plan to Stop TB 2006-2015“ – chce dosáhnout zlepšení diagnostiky a léčení u MDR a XDR-TB a zachránit tak alespoň 1,2 milionu životů do roku 2015.

Faktem je, že každý rok se formou MDR-TB nakazí 424 000 lidí. Děje se tak hlavně díky špatnému řízení kontroly a užívání léčiv, která v určitých oblastech neodpovídají dané formě tuberkulózy. Proto se MDR-TB šíří dále z člověka na člověka.

Horší formou TBC je pak XDR-TB přenášená mykobakteriemi rezistentními na většinu vysoce efektivních antituberkulotik. Opět je šířena mezi lidi díky špatné kontrole, diagnostice a léčbě. Tato forma TBC je především hrozbou v oblastech s vysokým výskytem HIV pozitivních osob. U nich může způsobit smrt během krátké doby.

Vytyčené cíle těchto programů

1. posílit kvalitu kontroly TBC a HIV/AIDS (hlavně v rozvojových zemích)
2. k naplnění cílů může dojít pouze přes správné řízení a uskutečňování vytyčených bodů plánů
3. posílit laboratorní vyšetření pro stanovení adekvátní včasné diagnózy MDR a XDR-TB
4. rozšířit surveillanci MDR a XDR-TB pro lepší porozumění významu (důležitosti) a trendům rezistence léčiv a souvislostí s HIV
5. vyvinout a aplikovat kontrolní měření nákazy k zamezení přenosu MDR a XDR-TB jako ochrana pro pacienty, zdravotnické pracovníky a oblasti s vysokým výskytem HIV nákazy
6. nutná je osvěta (poučení) lidí
7. důležité je získání a rozdělení finančních zdrojů
8. musí se propagovat výzkum a rozvoj nové diagnostiky, léčiv a vakcín

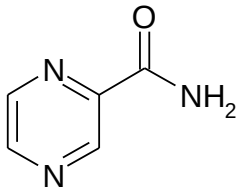
Global Response Plan 2007- 2008 uvádí přesné číselné (finanční) údaje, které bude třeba vynaložit k řešení vážné situace v oblasti šíření MDR a XDR-TB.

[17], [18]

1.7 ANTITUBERKUKOTIKA

1.7.1 Antituberkulotika 1.linie

a) Pyrazinamid



Pyrazinamid (PZA-amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny) je důležité léčivo 1. linie v léčbě tuberkulózy. Tato sloučenina má pozoruhodné sterilizační účinky, usmrcuje i spící mykobakterie (persistující tuberkulózní bacily). Působí pouze proti *M. tuberculosis* komplexu organizmů (*M. tuberculosis*, *M. africanum* a *M. microti*), avšak nepůsobí proti *M. bovis*.

Mechanizmus účinku: Pyrazinamid je proléčivo. Jeho aktivní formou je pyrazin-2-karboxylová kyselina, která vzniká působením bakteriální pyrazinamidasy/nikotinamidasy a zabudovává se do nikotinamidových nukleotidů namísto kyseliny nikotinové. Aktivita pyrazinamidu je závislá na pH prostředí, ve kterém má působit. Předpokladem toho jsou zjištěné MIC hodnoty pyrazinamidu, v pH 5,5 je 50 μg/ml. Při pH 5,8 se MIC = 100 μg/ml a při pH 6,1 je MIC = 200 μg/ml.

Za přítomnosti pyrazinkarboxylové kyseliny je v kyselém prostředí významně redukován uptake uracilu a methioninu, čímž dochází ke snížení syntézy RNA a proteinů. Inhibicí syntézy RNA, proteinů a uptake serinu dochází k narušení membránového potenciálu, který je nezbytný pro membránový transport. Cílovým místem působení pyrazinamidu a pyrazinkarboxylové kyseliny je tedy buněčná membrána, ve které dojde k narušení její funkce a membránového transportu. Kyselé pH je nezbytné pro aktivitu pyrazinamidu, jelikož usnadňuje vytváření protonizované pyrazinkarboxylové kyseliny a její průnik přes membránu a následnou kumulaci anionů a kationů kyseliny uvnitř buňky.Další význam kyselého pH, je zvýšení účinku pyrazinamidu a jeho schopnost snižovat membránový potenciál v jiných bakteriích. Tento fakt nebyl v kontextu s

pyrazinamidem dříve pozorován, až do té doby než bylo poukázáno na schopnost pyrazinamidu snižovat membránový potenciál. Pyrazinamid zkracuje dobu terapie TBC tím, že je schopen zabíjet nereplikující mykobakterie v kyselém prostředí. Staré nebo „polospící“ mykobakterie nemají aktivní metabolismus a ztrácejí zásoby energie, tím dochází ke snižování membránového potenciálu. Nízký membránový potenciál ve starých a nereplikujících mykobakteriích spolu s deficitem mechanismu efluxu pyrazinkarboxylové kyseliny a dále s relativně nízkou schopností udržovat membránový potenciál, vytváří slabinu pro atak pyrazinkarboxylovou kyselinou v kyselém prostředí. Mykobakteria pak zanikají na základě poškození membránového potenciálu, nikoliv na pH gradient. Membránový potenciál je nutný pro syntézu ATP F_1F_0ATPasou. Výsledkem je pokles syntézy ATP ve starých a spících mykobakteriích, které mají samotné již nízkou zásobu energie.

Rezistence:

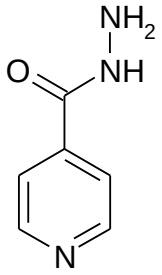
PZA-rezistentní klinické izoláty *M. tuberculosis* mají často narušenou strukturu pyrazinamidasy. Tato skutečnost dobře koreluje s faktem vzájemného vztahu rezistence pyrazinamidu a slabé účinnosti tohoto enzymu. Je známo, že hlavním důvodem PZA rezistence jsou mutace pncA genu. Tyto „missense mutace“ genu pncA se mohou vyskytovat v jeho třech místech, a to v poloze 3-17, 61-85 a 132-142 aminokyselin. Pro PZA rezistenci je jedinečný vysoký počet mutací genu pncA, avšak díky nepodstatnosti pyrazinamidasy jako enzymu, jsou tyto mutace tolerovány.

Jako léčivo se pyrazinamid dobře perorálně absorbuje a distribuuje do všech tkání a tělních tekutin včetně likvoru. Mezi nežádoucí účinky patří hepatotoxicita a nefrotoxicita, vzestup kyseliny močové a s tím spojený vznik dny, GIT potíže a bolesti hlavy.

Sloučenina 5-chlorpyrazin-2-karboxamid působí inhibičně na synthetasu I mastných kyselin (FAS I).

[26], [28], [31], [32]

b) Isoniazid

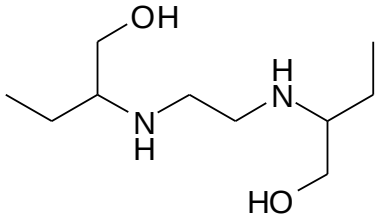


Isoniazid (INH) je hydrazid kyseliny isonikotinové. Působí výlučně na mykobakterie, na rostoucí formy baktericidně a na klidová stádia pouze bakteriostaticky. Jedná se o proléčivo, které ke své aktivaci, a tím získání antituberkulotického účinku potřebuje aktivovanou mykobakteriální katalasu. Tento enzym určuje citlivost *M. tuberculosis* k isoniazidu [6]. Pro úspěšné působení proti *M. tuberculosis* je nezbytný podíl jak pyridinu, tak hydrazidu. Různé deriváty isoniniazidu jsou buď méně účinné, nebo vykazují horší farmakokinetické vlastnosti. *M. tuberculosis* snadno podléhá působení isoniazidu, MIC hodnoty se pohybují v rozmezí 0,01-0,25 μg/ml. Isoniazid nevykazuje žádné účinky proti *M. tuberculosis* v anaerobních podmínkách. Mechanizmus účinku předpokládá interferenci se syntézou kyseliny mykolinové- důležité součásti mykobakteriální stěny. Isoniazid se v mykobakteriální buňce mění na kyselinu isonikotinovou, která se zde hromadí. Dochází k interferenci s kyselinou nikotinovou (niacinem), jejíž amid je součástí koenzymu NAD^+. NAD^+ je koenzymem oxidoreduktas. Působením isoniazidu je narušena funkce těchto enzymů, které se účastní syntézy kyseliny mykolinové.

Po perorálním podání se dobře absorbuje a distribuuje včetně likvoru. Eliminace spočívá v acetylaci a ve vylučování močí (částečně v nezměněné formě). Mezi nežádoucí účinky patří alergické reakce, hepatotoxicita, nedostatek vitamínu B_6 (tvorba hydrazonového komplexu) - postižení centrálního i periferního nervového systému. Při dlouhé monoterapeutické léčbě isoniazidem může vzniknout rezistence a mnoho buněk schopných tvořit kolonie (CFU) mohou začít v infikovaných orgánech znovu bujet.

[4], [26]

c) Ethambutol



Ethambutol (EMB) je syntetické chemoterapeutikum se strukturou blízkou D-arabinose. Po chemické stránce jde o syntetický aminoalkohol [dextro-2,2-(ethylendiimino)-di-1-butanol]. Poprvé bylo zavedeno v roce 1961. Sloučenina vykazuje bakteriostatický účinek a její spektrum aktivity zahrnuje *M. tuberculosis* a řadu další pomalu se dělících netuberkulózních mykobakterií. Mechanizmus účinku a základ molekulární rezistence není zcela známý. Rané studie zkoumající ethambutol uvádějí jako základ pro účinek a bakteriostatické vlastnosti prostorové uspořádání molekuly v absolutní *S,S* konfiguraci. Bylo navrženo několik možných hypotéz pro mechanizmus účinku EMB. Řada původních studií zabývajících se aktivitou struktury EMB ukazuje, že účinek přisuzovaný ethambutolu zahrnuje inhibici:

a) RNA metabolismu mykobakterií,

b) syntézy fosfolididů mykobakterií,

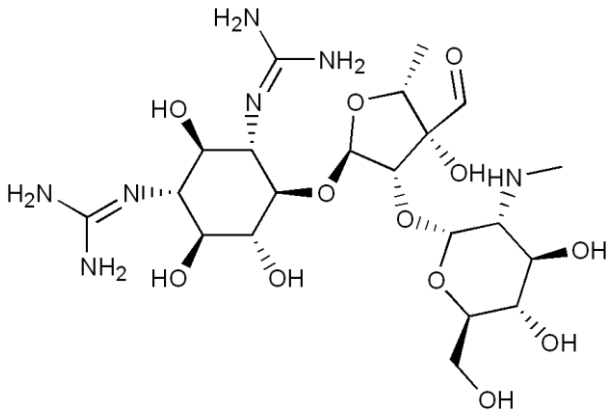
c) přenosu mykolových kyselin do buněčné stěny ve spojení s arabinogalaktanem,

d) syntézy spermidinu,

e) přeměny glukózy v monosacharidy (raná fáze přeměny), které se podílejí na tvorbě polysacharidů (arabinogalaktan a arabinomannan). Tyto látky tvoří buněčnou stěnu mykobakterií.

Nedávné studie ukázaly, že arabinosyltransferasa III. je zodpovědná za polymeraci arabinózy na arabinany, a dále pak na arabinogalaktany, které jsou nutné k syntéze buněčné stěny mykobakterií. Tento objev je považován za primární cíl léčby TBC. Tento derivát etylendiaminu je užíván v perorální formě ráno nalačno. Z nežádoucích účinků lze uvést např. neuritida n.optici (může vést k oslepnutí, zhoršení ostrosti vidění a k poruše vnímání zelené barvy). EMB je užíván v kombinacích s jinými antituberkulotiky především s isoniazidem a rifampicinem. [4], [26], [28], [29]

d) Streptomycin

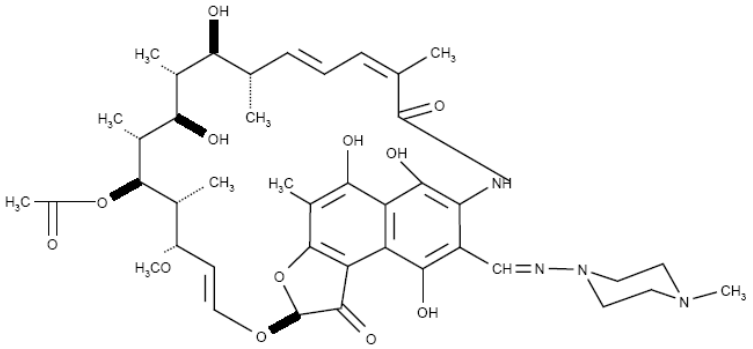


Streptomycin (STM) je aminoglykosidové antibiotikum s baktericidním účinkem izolované ze *Streptomyces griseus*, které se skládá ze tří komponent – streptidinu, streptózy a *N*-methyl-*L*-glukosaminu. Po mnoho let byl STM užíván jako léčivo 1. linie v léčbě TBC. Ačkoli byla u něho prokázána značná rezistence vůči *M. tuberculosis* při monoterapii, je tato látka stále běžně užívána v rozvojových zemích při počáteční léčbě TBC (první 2 měsíce chemoterapie) jako léčivo v kombinaci s dalšími antituberkulotiky 1. linie. Od roku 1960 postupně klesá v ekonomicky vyspělých zemích kvůli častým nežádoucím účinkům STM a díky existenci účinnějších léčiv užití tohoto antibiotika. Mechanizmus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30S, dále způsobuje chybné čtení genetické informace a inhibici v iniciální fázi translace mRNA. Rezistence STM byla intenzivně zkoumána u mnohých bakterií a jako výsledek se ukázal omezený počet chybných mutací v rpsL genu, který se podílí na kódování ribozomálního proteinu S12. Další mutace, způsobující rezistenci na STM, byly odhaleny u 16S rRNA genu (rrs) v nukleotidech 530 a 912.

Mezi jeho hlavní nežádoucí účinky patří poškození ototoxicita, nefrotoxicita, agranulocytóza, trombocytopenie a neutropenie.

[4], [29], [33]

e) Rifampicin

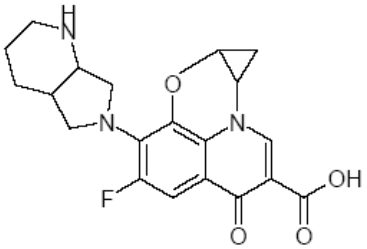


Tato látka je řazená mezi léčiva 1. linie v léčbě TBC. Rifamipicin je semisyntetickým ansamycinovým antibiotikem, které je produkováno kulturami *Streptomyces mediterranei*. V nižších dávkách vykazuje tato látka bakteriostatický a ve vyšších dávkách baktericidní účinek. Působí na aktivní i latentní formy TBC. Mechanizmus působení je založen na inhibici bakteriální DNA-dependentní RNA-polymerasy, která vytváří základní bílkoviny pro růst mykobakterií a je zodpovědná za kopírování jejich genetické informace. Navzdory důležitosti rifampicinu se v léčbě TBC objevují nové rezistentní kmeny mykobakterií, které způsobují globální problémy. Tato rezistence se vyskytuje během terapie aktivní TBC a vzniká mutací β-podjednotky genu ribozomální polymerasy. Rifampicin se po perorálním podání dobře absorbuje, lépe nalačno. Pacienta je třeba upozornit na nežádoucí účinky jako je hepatitida, trombocytopenie, GIT obtíže a oranžové zbarvení slin, moče, potu a slz. Tato látka patří mezi nejvýznamnější antituberkulotika, je rezervován prioritně na terapii TBC, v další řadě pak na atypická mykobakteria (*M. leprae*, stafylokokové infekce). Používá se v kombinaci s jinými antituberkulotiky, aby se předešlo riziku vzniku rezistence, a to především s isoniazidem a etambutolem.

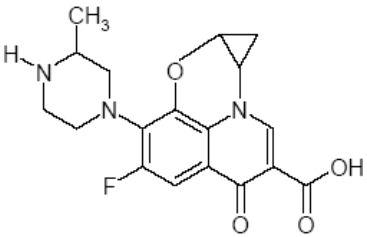
[26], [27], [30]

1.7.2 Další antituberkulotika používaná v terapii

a) Fluorochinolony



moxifloxacin



gatifloxacin

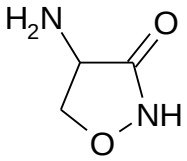
Sloučeniny struktury 7-fluor-4-oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-karboxylové kyseliny jsou důležitou skupinou fluorovaných látek. Vykazují silný antibakteriální účinek se širokým spektrem působení proti G+ a G- bakteriím, mykobakteriím, anaerobům a organizmů rezistentním na antibakteriální léčiva. Význam fluorochinolonů v boji proti infekční nemoci je datován od 80tých let minulého století, kdy byl vyvinut *norfloxacin*. Tato sloučenina vykazovala široké spektrum účinku a lepší farmakokinetický profil proti G- a některým G+ bakteriím díky kombinaci atomu fluoru na pozici 6 a piperazinilové skupině na pozici 7. Po tomto úspěšném objevu bylo nasyntetizováno velké množství fluorochinolonů s vylepšenými vlastnostmi jako je rozpustnost, antimikrobakteriální účinek, prolongovaný poločas rozpadu, nižší počet vedlejších účinků, perorální a parenterální cesta podání. Do této skupiny se jmenovitě řadí následující léčiva: levofloxacin, moxifloxacin, oxifloxacin, gatifloxacin a sparfloxacin. Primárně se užívají v případech zahrnujících rezistenci nebo nesnášenlivost k 1. linii antituberkulotik. Nejlepší baktericidní a sterilizační aktivitu vykazuje z uvedených moxiloxacin.

Mechanizmus účinku fluorochinolonů probíhá skrze inhibici dvou bakteriálních enzymů, které se podílejí na jejich množení. Enzymy se nazývají: (1) DNA gyrasa (topoizomerasa II) a (2) topoizomerasa IV. DNA gyrasa je enzym nezbytný při replikaci, transkripci a opravě bakteriální DNA. Topoizomerasa IV se podílí na odstranění propojení mezi dceřinými chromozómy, čímž dojde k rozdělení ve dvě dceřiné buňky na konci celé replikace. Pro G- organizmy je účinná DNA gyrasa, pro G+ bakterie je účinnější topoizomerasa IV. Vyšší efektivity nových fluorochinolonů ve srovnání

s dřívějšími fluorochinolony se dosahuje díky jejich dvojitému účinku proti DNA gyrase a proti topoizomerase IV. Tím se také zabraňuje rezistenci na fluorochinolony.

[26], [27], [30]

b) Cykloserin



Cykloserin ((*R*)-4-amino-isoxazolidin-3-on) ze *Steptomyces garyphalus* respektive *Steptomyces orchidaceus* je antibiotikum se širokým spektrem účinku. Působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, včetně mykobakterií. Připravuje se výhradně synteticky z hydrochloridu methylesteru D-serinu, který se reakcí s chloridem fosforečným převede na methyl-2-amino-3-chlorpropanoát. Ten s hydroxylaminem cyklizuje na cykloserin.

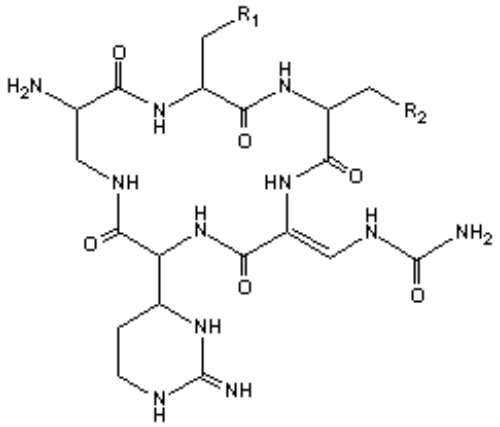
Mechanizmus účinku je založen na inhibici enzymů alanin-racemasy (konvertuje *L*-ala na *D*-ala) a *D*-alaninsyntetasy. Tím se brání biosyntéze peptidoglykanu (syntéze buněčné stěny).

Cykloserin se dobře absorbuje z GIT a distribuuje do tkání. Většina látky je aktivně vyloučena do moči.

Užívá se jako antituberkulotikum v kombinacích, když jsou kmeny *M. tuberculosis* rezistentní k antituberkulotikům 1.linie.

[34]

c) Kapreomycin



Tato sloučenina je cyklický peptid. Tato látka má schopnost působit proti široké škále bakterií, která zahrnuje také bakterie vyvolávající tuberkulózu. Mají baktericidní účinek.

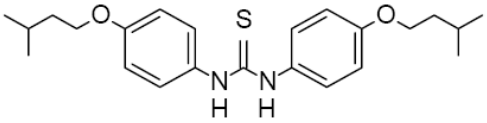
Mechanizmus účinku je založen na vazbě kapreomycinu na 70S ribozomální podjenotku, a tím dochází k syntéze abnormálních proteinů. K průniku polypeptidů do buňky dochází pomoci na kyslíku závislého aktivního transportu v rámci polyamidového transportního systému.

Polypeptidová antibiotika působí baktericidně a tento účinek je podpořen působením „agenta“, který zabraňuje syntéze buněčné stěny.

Kapreomycin se jako léčivo užívá v kombinacích s jinými léčivy působícími na mykobakterie, které je velmi obtížné eliminovat. Při užívání kapreomycinu v monoterapii vzniká v krátkém období rezistence. Je užíván v případě, když ostatní léčiva s antituberkulotickou aktivitou již vykazují rezistenci. Kapreomycin se podává injekčně kvůli jeho nízké absorbci z trávicího traktu. Mezi jeho nejčastější nežádoucí účinky patří nefrotoxicita (poškození buněk tubulů) a otoxicita.

[35]

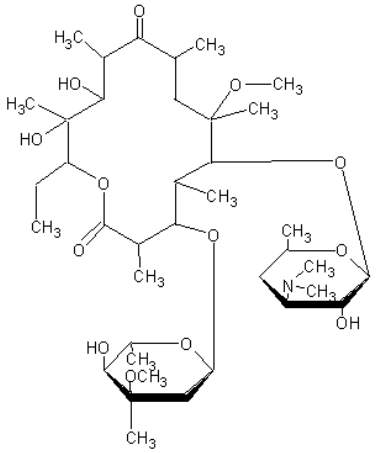
d) Isoxyl



Isoxyl (thiokarlid 4,4´-diisoamyloxydifenylthiomočovina) je znám jako účinné antituberkulotikum v klinickém užívání. Je účinný i proti MDR-TB. V současné době bylo prokázáno, že isoxyl má značnou antimykobakteriální *in vitro* aktivitu a působí proti různým klinickým izolátům „multidrug“ rezistentních kmenů *M. tuberculosis* v citlivém rozsahu 1-10 μg/ml. Mechanizmus účinku této látky je založen na inhibici syntézy mykolových kyselin buněčné stěny a krátkých řetězců nenasycených mastných kyselin.

[36]

e) Makrolidy



klarithromycin

Makrolidy jsou bakteriostatická ATB středně širokého antimikrobního spektra. Užívají se při léčbě bakteriálních infekcí respiračního systému. Vykazují též účinek u dalších druhů mykobakterií jako je *M. leprae* a *M. avium*. Jsou odvozená od erythromycinu (1952), jehož struktura je tvořena 14ti členným makrocyklickým laktonovým kruhem, k němuž jsou připojené dva cukerné zbytky. Bohužel byl rozvoj makrolidů omezen kvůli nedostatečné účinnosti proti tuberkulóznímu bacilu na případy MDR-TB. Rezistence makrolidů k mykobakteriálnímu komplexu existuje kvůli výskytu genu erm37 u mykobakterií. V současnosti je nejvíce účinným makrolidem klarithromycin, který inhibuje 8 z 23 kmenů *M. tuberculosis* s MIC $\leq$ 8 μg/ml. Do této skupiny dále patří erythromycin, spiramycin, josamycin, roxithromycin, dirithromycin a azithromycin.

Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin. Makrolidy se váží reverzibilně na receptor umístěný na 50S podjednotce ribosomu, a tím dojde k inhibici bakteriální syntézy proteinů.

Novější deriváty se od erythromycinu liší velikostí a substitucí laktonového kruhu.. Společné nežádoucí účinky zahrnují špatnou gastrointestinální toleranci.

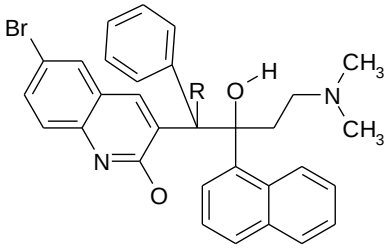
Použití:

Většina makrolidových ATB sice inhibuje růst mykobakterií, ale nemají dostatečně vysokou antituberkulotickou aktivitu. Pouze azitromycin vykazuje účinnost na atypická mykobakteria (*M. avium, M. chelonei, M. fortuitum*).

[27],[29]

1.7.3 Potencionální antituberkulotika

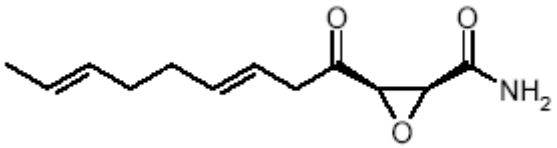
a) Diarylchinolony



Nová skupina léčiv, která je příbuzná s chinolony a fluorochinolony. Blokují syntézu bakteriální ATP syntetasy a mohou potlačit růst mykobakterií do jednoho týdne. V současné době existuje 20 molekul s antituberkulotickou aktivitou. Nejvíce účinnou látkou z této série je R207910. Je to čistý enantiomer se dvěmi chirálními centry. Směs diastomerů je připravována v 5ti krocích a R207910 je získána z výsledné směsi čtyřech izomerů. Jedna z předností této látky je selektivní antimykobakteriální aktivita *in vitro*. MIC pro *M. tuberculosis* je 0,03-0,12 µg/ml a pro ostatní mykobakterie (*M. smegmatis*) 0,003-0,500 µg/ml, což jsou celkem nízké hodnoty. Kdežto vyšší MIC vykazují testy u běžných patogenů jako je *Staphylococcus aureus* (MIC > 32 µg/ml), *Streptococcus pneumoniae* (MIC > 32 µg/ml). Tato selektivní aktivita by se mohla osvědčit k úspěšnému snižování klinického užití výhradně u léčby TBC a non-TBC mykobakterií a tím omezit rozvoj lékové rezistence. R207910 vykazuje *in vitro* aktivitu u kmenů *M. tuberculosis* rezistentních na existující antituberkulotika (isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol, pyrazinamid a moxifloxacin). Výzkum také ukázal, že inhibuje růst MDR-TB kmenů. Objev rezistence mykobakterií k této látce je spojen s rezistencí k rifampicinu. Tyto rezistentní kmeny však snadno podléhají jiným antituberkulotikům. Dospělo se k názoru, že R207910 inhibuje protonovou pumpu *M. tuberculosis* (Mechanizmus účinku spočívá v inhibici mykobakteriální protonové pumpy F_0 F_1 H^+ ATPasy.

[27]

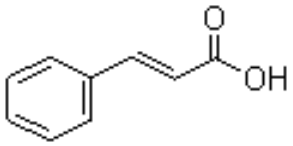
b) Cerulenin



Cerulenin je inhibitorem syntetasy mastných kyselin typu I a II, a to skrze ireverzibilní inhibici β-ketoacyl syntetasy, která slouží jako enzym pro kondenzaci v biosyntéze mastných kyselin. Buněčná stěna mykobakterií zahrnuje velké množství komplexů lipidů, které se skládají z dlouhých řetězců mastných kyselin. Produkty syntetasy mastných kyselin jsou mastné kyseliny s dlouhými řetězci. Mykobakterie obsahují syntetasu mastných kyselin typu I a II. Autoři se domnívají, že jedinečné působení ceruleninu na mykobakterie je založeno na působení proti syntetasám mastných kyselin typu I a II. Ukázalo se, že cerulenin vykazuje *in vitro* synergistické působení v kombinaci s rifampicinem, isoniazidem, ofloxacinem, amikacinem a klofaziminem. Jeho účinek je srovnatelný s ethambutolem. Současné výzkumy potvrdily inhibici u řady mykobakterií zahrnujících i rezistentní *M. tuberculosis* s hodnotou MIC v rozmezí 1,5- 12,5 µg/ml.

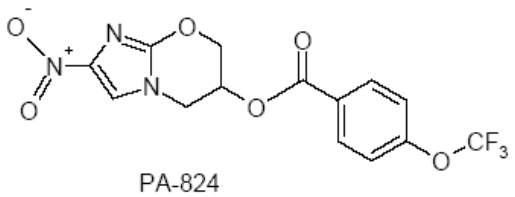
[27]

c) kyselina trans-cinnamová



Trans-cinnamová kyselina vykazuje synergistické působení při použití s řadou antituberkulotik (rifampicin, isoniazid, ofloxacin, amikacin a klofazimin), a to u deseti z osmnácti kombinací. Tento synergistický účinek vykazuje kyselina u citlivých i rezistentních organizmů. I přes tento zdárný objev byl další výzkum *trans*-cinnamové kyseliny pozastaven [27].

d) Nitroimidazopyrany



Tyto sloučeniny jsou svojí strukturou příbuzné antimykobakteriální látce *metronidazolu*. Použití nitroimidazopyranu bylo zamýšleno pro oblast onkologie, kde by tyto látky sloužily jako radiosenzitizéry. Avšak jejich použití bylo rozšířeno i pro oblast léčby TBC, neboť vykazují účinek proti kulturám replikujících se *M. tuberculosis*. Ve vývoji těchto sloučenin bránily jejich mutagenní vlastnosti, které jsou u sloučenin vyvíjených v současné době vyrušeny, i když si látky zachovávají antituberkulotickou aktivitu.

Nejaktivnější zástupci:

1. **PA-824**

V současné době je tato látka ve fázi klinického vývoje. Byla u ní *in vitro* prokázána aktivita proti *M. tuberculosis*. Účinek vykazuje jak proti pomalu se dělícím, tak i proti rychle se dělícím mykobakteriím. Předpokládá se účinek na latentní formy i multirezistentní kmeny *M. tuberculosis*. MIC této látky se pohybuje v rozmezí 0,015-0,250 μg/ml. PA-824 také vykazuje dobrou *in vitro* aktivitu u MDR-TB izolátů s MIC v rozmezí 0,039-0,531 μg/ml. Mechanizmus účinku je jedinečný. Inhibuje syntézu ketomykolové kyseliny. Rovněž tato látka inhibuje syntézu bílkovin a mastných kyselin, které jsou nezbytné pro syntézu buněčné stěny. PA-824 je proléčivem, u něhož dochází k redukci nitroskupiny na aminoskupinu. Tato látka vykazuje tuberkulocidní účinek při perorálním podání.

[27], [30]

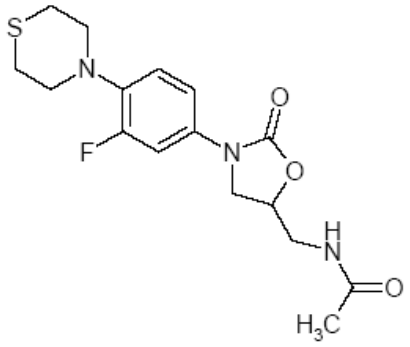
2. **OPC-67683**

Farmaceutická společnost Otsuko, Japonsko připravila sérii opticky aktivních 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazolů pro léčbu TBC. Jako účinnou se jeví OPC-67683 sloučenina se silnou *in vitro* a *in vivo* aktivitou proti citlivým i rezistentním kmenům *M. tuberucolsis*.

In vitro data

Tato sloučenina byla podrobena testům proti standardním i proti klinicky izolovaným kmenům *M. tuberculosis*. Proti standardním kmenům (zahrnují citlivé i monorezistentní kmeny) vykazovala MIC překvapivě nízkou (0,006-0,012 μg/ml). *In vitro* aktivita byla porovnána s aktivitou u isoniazidu, rifampicinu, streptomycinu, ethambutolu, a PA-824. Výsledky byly shledány jako výrazně nižší u OPC-67683. U testování OPC-67683 proti klinicky izolovaným kmenům byly výsledky velmi překvapivé. OPC-67683 vykázala MIC 0,012 μg/ml, což je minimálně 8krát silnější účinek než u ostatních testovaných léčiv. Dále byl prokázán účinek proti rezistentním kmenům, při kterém nebyla potvrzena zkřížená rezistence s některým z užívaných antituberkulotik. Při současném podání více léčiv proti TBC nepůsobí jako jejich antagonista. OPC-67683 taky účinkuje proti intracelulární *M. tuberculosis* v T buňkách. Tento účinek je porovnatelný s rifampicinem ve vyšších koncentracích a je lepší než u isoniazidu a PA-824 [27].

e) Oxazolidinony



PNU-100480

Tyto látky představují novou skupinu s antimykobakteriální aktivitou v posledních 20ti-30ti letech. V roce 1987 byly objeveny 2 sloučeniny DuP 721 a DuP 105. Tyto látky vykazovaly parenterální a perorální aktivitu. Kvůli jejich toxicitě byl jejich další vývoj pozastaven. Bez ohledu na tyto komplikace se 2 farmaceutické společnosti rozhodly pokračovat ve zkoumání těchto látek. V roce 1996 byly uveřejněny 2 netoxické deriváty pod názvy eperezolid (U-100592) a linezolid (U-100766). Dosud je v klinické praxi používaný pouze linezolid, který vykazuje dobrou *in vitro* i *in vivo* aktivitu. Jiné sloučeniny z této skupiny vykazují srovnatelnou aktivitu s isoniazidem a rifampicinem (MIC= 2-4 μg/ml), avšak nebudou v budoucnu připravovány (např. PNU-100480). Nejnovější současné sloučeniny – RBx 7644 a RBx 8700 – vykazují slibnou MIC proti MDR-TB kmenům. Mechanizmus účinku spočívá v inhibici zahájení syntézy peptidového řetězce, kdy se na sebe navazují ribozomy, mRNA a „startovní komplex tRNA + aminokyselina“.

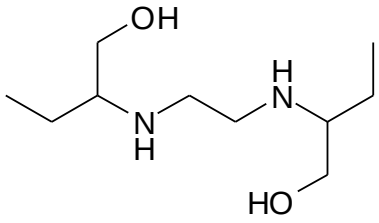
Jak již bylo uvedeno, v klinické praxi je z této skupiny látek používaný pouze linezolid. Proto zde blíže popíši jeho vlastnosti. V perorálním užití má 100%ní biodostupnost a maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 1-2 hodiny po požití. Tato látka vykazuje nízkou vazbu na plazmatické bílkoviny a bez omezení se distribuuje do dobře propustných tkání.

[27]

f) Pyrroly

Výzkum některých azolových derivátů vykázal silný inhibiční účinek *in vitro* a *in vivo*. To vedlo k odhalení pyrrolového derivátu BM 212 jako mimořádně silné léčivo se selektivně antimykobakteriálními účinky. Jeho MIC se pohybuje v rozmezí 0,7 – 1,5 µg/ml. U mnoha kmenů *M. tuberculosis* zahrnující kmeny rezistentní k ethambutolu, isoniasidu, amikacinu, streptomycinu, rifampicinu a rifabutinu. Jeden kmen rezistentní na amikacin vykázal vyšší MIC, která má hodnotu 6,25 µg/ml. BM 212 inhibuje intracelulární mykobakterie podle způsobu dávkování (cca do sedmi dní). MIC se pohybuje v hodnotě 0,5 µg/ml, při koncentraci v hodnotě 1,0 µg/ml směřuje ke 100%ní inhibici. Tato látka vykazuje silný účinek proti kandidám. BM 212 slouží jako základní struktura pro vývoj dalších sloučenin s ještě vyššími antimykobakteriálními účinky. V současné době byly uvedeny deriváty s pyrrolovým jádrem na pozici 1 a 5. Nejnovější sloučeninou z těchto výzkumů je 1-(4-fluorfenyl)-2-methyl-3-(thiomorfolin-4-yl) methyl-5-(4-methylfenyl)-1H-pyrrol,5. Tato sloučenina je velmi aktivní proti *M. tuberuculosis* s MIC = 0,4 µg/ml a vykazuje vysoký index ochrany (160). Oproti této sloučenině vykazují isoniasid a rifampicin index ochrany pouze 128. K jiným pyrrolům jako je LL-3858 existují pouze dílčí informace. Tato látka je v současné době v 1. fázi klinických studií. V murinových modelech vykazuje LL-3858 vysoký baktericidní účinek na rozdíl od monoterapie s isoniazidem. Preklinické studie na zvířatech ukázaly, že se tato látka dobře absorbuje při hodnotách v séru vyšších než MIC, má lepší poločas rozpadu a C_{max} než isoniazid [27].

g) Analoga ethambutolu

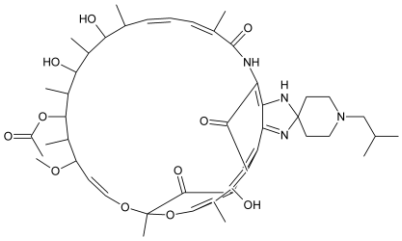


Díky jednoduché struktuře etambutolu a účinku proti *M. tuberculosis* se kombinatoriální chemie začala zabývat přípravou derivátů etambutolu. Touto metodou bylo otestováno přes 63000 sloučenin na *in vitro* účinek proti *M. tuberculosis*. Skrze proces úspěšnosti testů *in vitro* a *in vivo* byla vyselektována jedna velmi úspěšná látka – SQ 109. Její struktura je založena na 1,2-dietylendiaminu a obsahuje ve své struktuře tricyklický fragment adamantin. Tricyklický fragment přispívá k dobrému umístění této sloučeniny v plicích, jak je patrné i u jiných látek obsahujících adamantin (např. rimantadin). SQ 109 bylo testována proti citlivým i monorezistentním kmenům *M. tuberculosis*. MIC SQ 109 proti Erdman je 0,385 μg/ml, proti etambutol rezistentním kmenům je 0,77 a 0,54 μg/ml, proti izoniazid rezistentním kmenům je 0,77 μg/ml a proti rifampicin rezistentním kmenům je ≤ 0,385 μg/ml. Nízká MIC hodnota proti etambutol rezistentním kmenům je obzvláště zajímaných a povzbudivým výsledkem. Výzkumníci v této oblasti se domnívají, že SQ 109 jiný cíl působení než etambutol, odlišný mechanizmus účinku a cestu působení na mykobakterie [27].

h) Rifamyciny

Rifamycinová antibiotika jsou známa jako jedny z nejvíce účinných antituberkulotik. Jejich objevení a široké použití znamenalo obrat v léčbě TBC, protože se díky těmto látkám zkrátila doba léčení na šest měsíců. Mezi rifamyciny se řadí: rifampycin (někdy uváděný pod názvem rifampin), rifabutin, rifapentin, rifalazil a rifametan. Bližší informace o charakteristice a mechanizmu působení rifampicinu jsou uvedeny v samostatné kapitole.

Rifabutin



Tato sloučenina je prvním rifamycinem schváleným FDA (Food and Drug Administration) na prevenci Mycobacterium avium komplex (MAC) způsobujících onemocnění u lidí s virem HIV. Lidé s MAC jsou silně vyčerpaní, mají nízkou hmotnost, bolesti břicha, noční pocení, horečky, ledvinnou nedostatečnost a jsou v ohrožení života. Rifabutin je používán v kombinaci s jinými léčivy například ciprofloxacin, ethambutol, amikacin, azitromycin a klaritromycin. Ve studiích srovnávajících aktivitu mezi sloučeninami ze skupiny rifamycinů dosáhl rifabutin srovnatelné nebo i vyšší sterilizační účinky než rifampycin. Studie potvrdily, že časná baktericidní aktivita rifabutinu je nižší než aktivita rifampycinu.

Rifapentin

Tento substituovaný cyklopenyil byl schválen FDA v roce 1998 a má stejné spektrum účinků jako rifampicin. Důležitý rozdíl mezi těmito dvěma léčivy je v poločase rozpadu. Rifapentin ho vykazuje 4krát delší, a to díky své vysoké lipofilitě, která usnadňuje penetraci látky přes tkáně.

Rifalazil

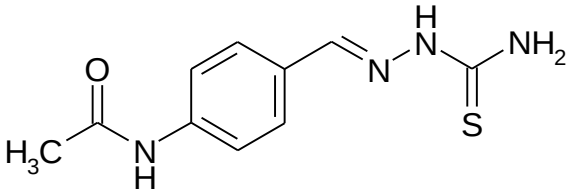
Tato sloučenina je derivátem bensoxazinorifamycinů, která je také uváděná pod názvem KRM 1648. Vykazuje silný baktericidní účinek proti *M. tuberculosis in vitro* i *in vivo*. Studie *in vitro* prokázaly, že rifalazil 64krát účinnější proti *M. tuberculosis* než rifampycin. Má dobrou perorální aktivitu a poločas rozpadu 60 hodin.

Rifametan

Tento semisyntetický analog, který je uváděn i pod označení SPA-S-565, se v současné době nachází ve druhé fázi farmakokinetických studií. Již v první fázi vykazoval lepší výsledky než rifampycin.

[26], [27], [30]

i) Thioacetazon



Tato sloučenina užívaná v léčbě tuberkulózy vykazuje pouze slabou aktivitu proti *M. tuberculosis* . Slouží spíše k předejití rezistence na účinnější léčiva jako je isoniazid a rifampicin. Nepoužívá se jako léčivo samostatně, nýbrž v kombinacích. Působí podobně jako ethambutol. Léčba thioacetazonem je výhodná z důvodu ceny, protože je velmi levný, a proto je užíván především v zemích třetího světa. Avšak i zde jeho použití klesá. Thioacetazon způsobuje závažné, častokrát až fatální, kožní reakce u HIV pozitivních pacientů. [37]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 LÉČIVA NA BÁZI PYRAZINU PŘÍRODNÍHO A SYNTETICKÉHO PŮVODU

Nesubstituovaný pyrzin, 1,4-diazin, představuje velice symetrickou molekulu. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů a chová se jako slabá dvojsytná báze. Jednoduché pyraziny, nejčastěji alkylované, alkoxylované či sirné deriváty se v přírodních zdrojích vyskytují v relativně malých množstvích. V rostlinách a hmyzu plní pyraziny úlohu atraktantů, feromonů či signálních látek, v potravinách mají výrazné senzorické vlastnosti (vonidla, chutidla).

Mechanismus tvorby pyrazinového jádra v přírodních zdrojích spočívá v autokondenzaci α-aminokarbonylových sloučenin, popř. kondenzaci α,β-dikarbonylových a α,β-diaminosloučenin, vznikajících při fermentaci sacharidů a bílkovin.

Biologicky aktivní pyraziny jsou jak přírodního, tak syntetického původu. Rozmach syntézy pyrazinových sloučenin nastal teprve na přelomu 70. a 80. let 20.století.

Vedle příznivých léčebných účinků se objevily i zprávy o nežádoucích a toxických vlastnostech. Velmi toxické diaziny (resp. imidazochinoxaliny) vznikají zahříváním směsi sacharidů, aminokyselin a kreatininu. Ke tvorbě karcinogenních a mutagenních heterocyklických aminů (pyrazinů, pyridinů) dochází zejména při zahřívání masa. Jedná se o typické produkty Maillardovy reakce, neboli neenzymového hnědnutí, které nastává zahříváním nebo skladováním produktů, které obsahují cukry, aminokyseliny nebo jiné dusíkaté látky.

2.1.1 Pyrazin v přírodních sloučeninách:

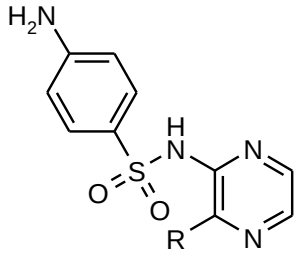
- kakaové máslo a kakaové boby (chuť a vůně) → 2,3-dimethylpyrazin
  2-ethyl-3,5-dimethylpyrazin
  triethylpyrazin
- červené víno → 3-isopropyl-2methoxypyrazin
- vařené a smažené jídlo (vařené hovězí maso, sýr, pivo…)

Pyrazinové sloučeniny jsou tvořené celou řadou plísní.

- baktericidně účinné antibiotika kyselina aspergillová (6-sec-2-hydroxy-3-isobutylpyrazin-1-oxid) z *Aspergillus flavus*.
- antifungálně aktivní pigment kyselina pulcherriminová (kyselina je produkována kvasinkou *Candida pulcherrima*
- antifungálně aktivní sloučenina izolovaná z kmene *Streptomyces*- ememycin (3-hydroxypyrazin-1-oxid).

2.1.2 Pyrazin v syntetických sloučeninách:

Synteticky připravované pyraziny vykazují rovněž celou škálu farmakologických účinků. Řada z nich se používá jako důležitá léčiva. Prvními léčivy, která byla zavedena do klinické praxe, byla sulfonamidová chemoterapeutika sulfapyrazin (2-sulfanylaminopyrazin v roce 1941) a jeho později zavedená strukturní varianta sulfalen. Pyrazinové jádro zde není farmakoforem; 1,4-diazin v těchto molekulách je součástí postranního substituentu ovlivňujícího pouze farmakokinetické vlastnosti léčivé látky.



sulfapyrazin (R = H)
sulfalen (R = OCH_3)

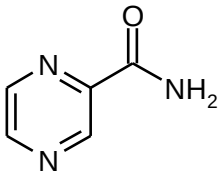
Diametrálně odlišná role připadá pyrazinovému kruhu v případě antituberkulotika *pyrazinamidu* (amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny). Jedná se o prekurzor (proléčivo), neboť uvnitř tuberkulotické buňky hydrolýzou vzniká antimykobakteriálně velmi aktivní pyrazin-2-karboxylová kyselina. Mechanizmus účinku pyrazinamidu spočívá v intracelulární inhibici nikotinamidasy, resp. pyrazinamidasy.

Modifikace struktury antituberkulotika pyrazinamidu se stala od konce 50tých let 20. století nosným programem řady laboratoří, které se snažily a stále se snaží vyvinout antimykobakteriálně aktivnější léčivo než pyrazinamid. K perspektivním látkám patří jednoduché chlorované pyrazinové deriváty, které mají charakter proléčiv (estery či amidy pyrazinkarboxylové kyseliny: *terc*-butylester 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny; 5-chlorpyrazin-2-karboxamid).

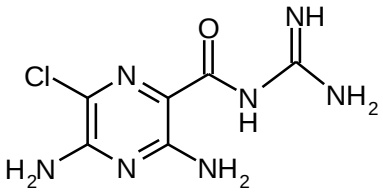
Dalšími syntetickými látkami obsahujícími pyrazinový kruh jsou například:

- kalium šetřící diuretikum *amilorid*, často užívaný v léčbě hypertenze,
- perorální antidiabetikum *glipizid* s výraznou hypoglykemickou aktivitou,
- *eszopiklon* jako první látka z rodiny nebenzodiazepinových hypnotik.

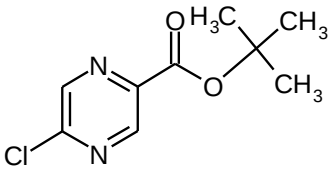
[19]



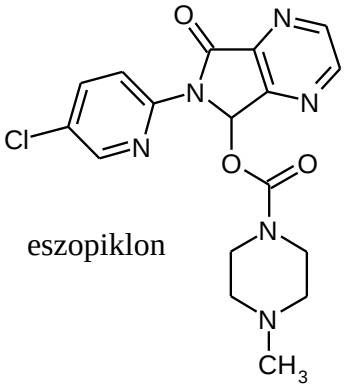
pyrazinamid



amilorid



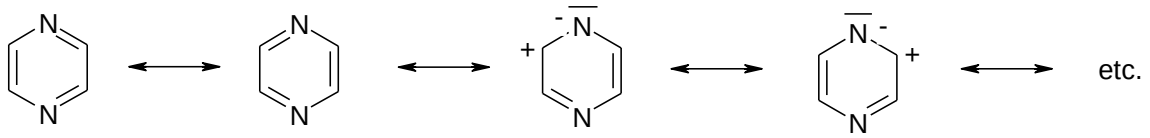
terc-butylester 5-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



eszopiklon

2.2 VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA

Pyrazin, 1,4-diazin, představuje vysoce symetrickou molekulu. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů a chová se jako slabá dvojsytná báze (pK_1= 0,57; pK_2 = 5,51). Pyrazinové jádro je planární útvar, který může být znázorněn jako rezonanční hybrid několika základních struktur.



Z hustot Π-elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota Π-elektronů je zvýšená na dusíkatých atomech oproti uhlíkatým atomům. Vypočtené hodnoty se od naměřených téměř neliší. Z toho plyne, že hustoty Π-elektronů na α-uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi podobné a můžeme proto očekávat podobnou chemickou reaktivitu α-substituovaných pyrazinů a pyridinů.

Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkatého atomu značně ovlivňuje geometrické molekuly.

Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substancím, např. Friedel-Craftsovým aromatickým substitucím, které vedou k přípravě arylketonů. Přímý elektrofilní atak je ztížen induktivním efektem dusíkových atomů pyrazinu, a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou z tohoto důvodu substituce nukleofilní.

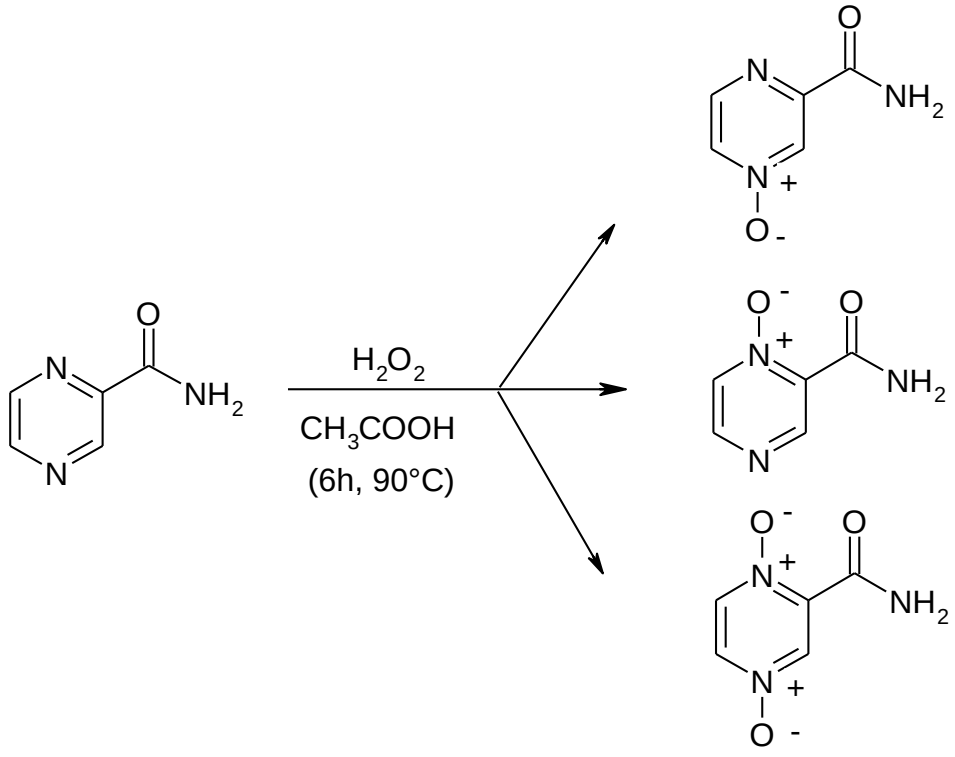
[19]

2.3 PŘÍPRAVA *N*-OXIDŮ

N-oxidy pyrazinu se nejčastěji připravují pomoci peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci H_2O_2 přechází pyrazin na 1-mono nebo 1,4-dioxid [20].

V mém případě jsem použila jak výchozí sloučeninu pyrazinamid. Po oxidaci pomocí H_2O_2 v prostředí kyseliny octové za podmínek 6 h., 90 ^oC vzniká směs tří pyrazin-*N*-oxidů v poloze 1-*N*-oxid, 4-*N*-oxid nebo 1,4-*N*,*N*-dioxid.

Pro syntézu dalších látek užívám pouze 1-*N*-oxid-pyrazinkarboxamidu.



[22]

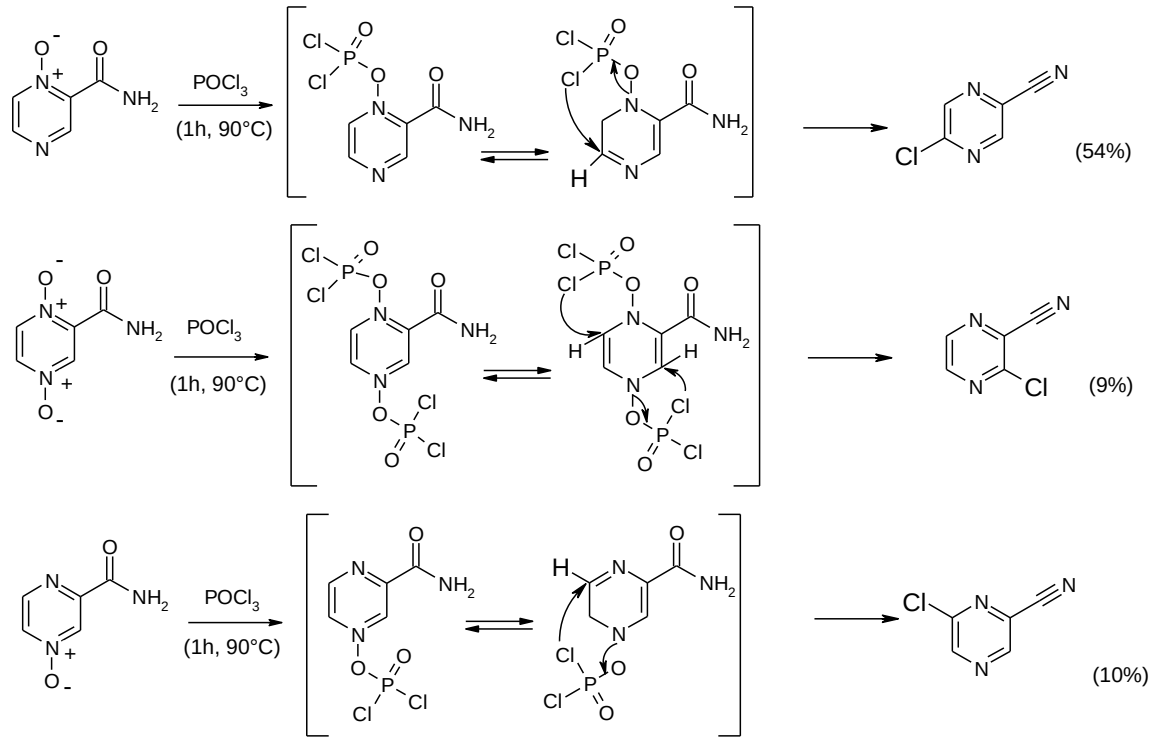
2.4 HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA

Obecně:

Halogenpyraziny umožňují přípravu mnoha jinak nedostupných derivátů díky snadné záměně atomu halogenu za nukleofil (molekula s volným elektronovým párem). Halogenderiváty se dají připravit třemi klasickými způsoby. První z metod spočívá v přímé reakci pyrazinu s halogenem v plynné fázi, druhá metoda je založená na záměně hydroxylu či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu či bromidu fosforylu. Nejčastěji se však halogenderiváty pyrazinu připravují nukleofilní halogenací *N*-oxidu pyrazinu. Halogenace probíhá nejčastěji do polohy 2, méně často do polohy 3 . [21]

Moje syntéza:

Následnou chlorací *N*-oxidu-pyrazinkarboxamidu působením $POCl_3$ (fosforoxychloridu) za odštěpení molekuly vody (dehydratace) vzniká směs tří chlorovaných pyrazinkarbonitrilů. A to: 3-chlorpyrazin-2-karbonitril, 5-chlorpyrazin-2-karbonitril a 6-chlorpyrazin-2-karbonitril. Jednotlivé látky se od sebe oddělují „flash“ kolonovou chromatografií.



[22], [23]

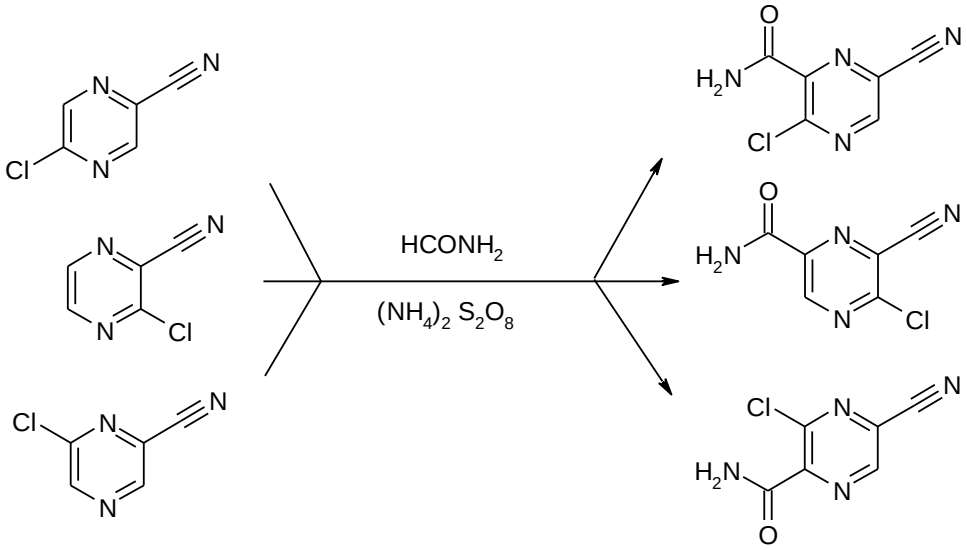
2.5 AMIDACE

Amidace je dalším krokem v syntéze sloučenin. Probíhá za pomoci formamidu ($HCONH_2$) a persíranu amonného ($(NH_4)_2S_2O_8$).

Vzniká směs tří produktů :

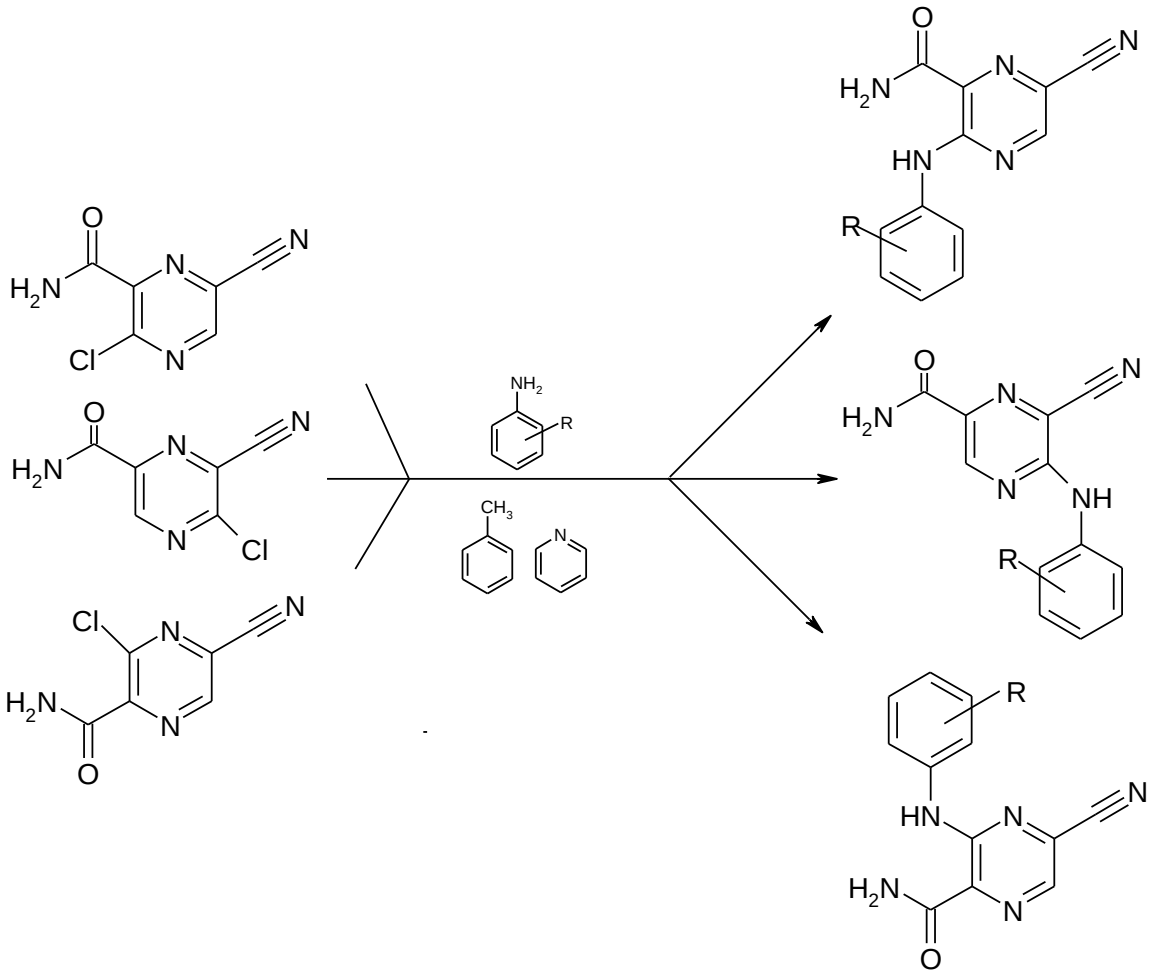
3-chlor-5-kyanpyrazin-2-karboxamid, 5-chlor-6-kyanpyrazin-2-karboxamid a 3-chlor-6-kyanpyrazin-2-karboxamid [24].

Na další syntézu užívám 3-chlor-5-kyanpyrazin-2-karboxamid.

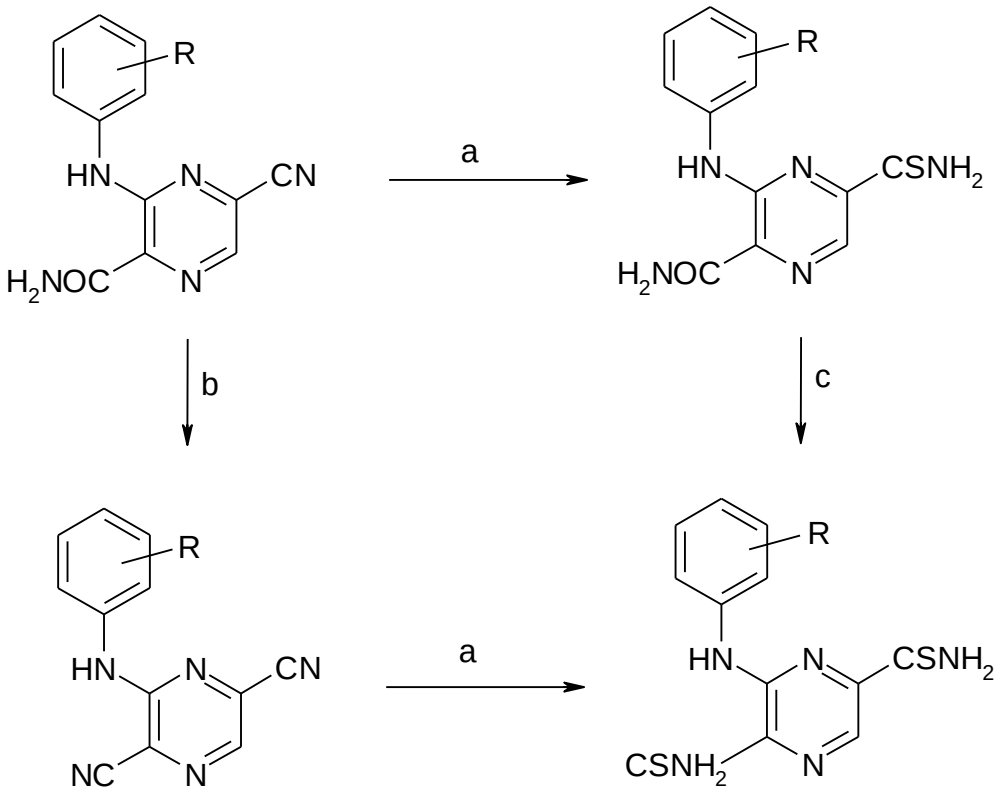


2.6 AMINODEHALOGENACE

Touto reakcí dochází k navázání arylu na pyrazinové jádro a k odštěpení kyseliny chlorovodíkové díky působení pyridinu.



2.7 PŘÍPRAVA FUNKČNÍCH DERIVÁTŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN



R = alkyl, halogen, nitril, alkynyl
a…$(NH_4)_2S/CH_3OH$, b…$POCl_3$, c…Lawessonovo činidlo

[25]

V mém případě se jedná o chemickou syntézu za použití činidla a) (sirníku amonného v prostředí methanolu) za vzniku karboxamidů a karbothioamidů a činidla b) (fosforoxychloridu) za vzniku dikarbonitrilů. Použití činidla c) (Lawessonova činidla) je pro získání karbothioamidů také možné, avšak já jsem tento krok neprováděla.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

U použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty. Rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna obvyklým způsobem.

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách SILUFOL UV 254 (Kavalier, Votice, ČR) za použití vyvíjecí soustavy toluen - aceton (1:1). Deriváty pyrazinu obsahující volnou karboxylovou skupinu byly vyvíjeny v soustavě propanol - amoniak (2:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku BOËTIUS PHMK 05 (VEB KOMBINAT NAGEMA, VEB Wägetechnik RAPIDO, Radebeul, Německo) a jsou nekorigované.

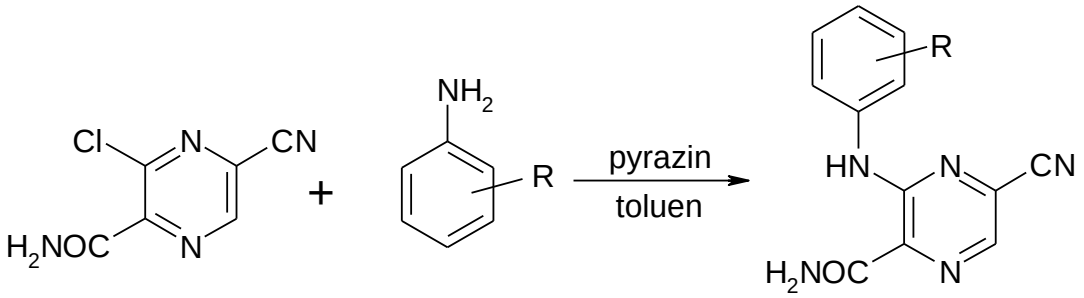
Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano, Itálie) provedla paní Hronová na KFCHKL.

Infračervená spektra byla změřena paní Vencovskou na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg KBr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1}. ^{1}H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkury – Vx BB 300 (299,95 MHz – ^{1}H and 75,43 MHz – ^{13}C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k $Si(CH_3)4$.

Log *P* sloučenin byl vypočten pomocí programu CS ChemOffice Ultra, verze 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.).

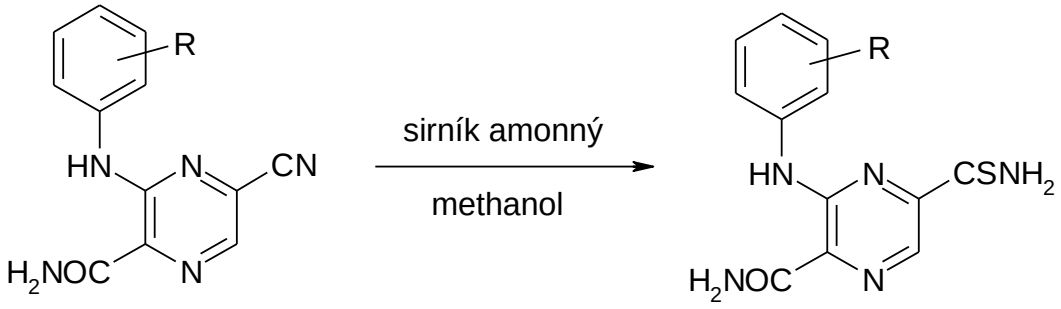
3.2 POPIS JEDNOTLIVÝCH SYNTÉZ

AMINODEHALOGENACE

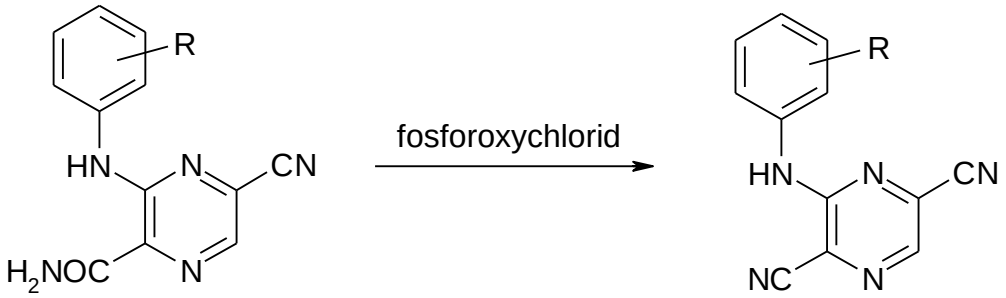


2-karbamoyl-3-chlor-5-kyanpyrazin (3 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém toluenu (50 ml), přidal se arylamin (3 mmol) a pyrazin (3 mmol) a směs se nechala vařit pod zpětným chladičem 1 hodinu při 110 °C. Po vaření se směs zfiltrovala, rozpouštědlo se oddestilovalo za sníženého tlaku na vakuové rotační odparce a surový produkt byl překrystalizován ze směsi voda/ethanol.

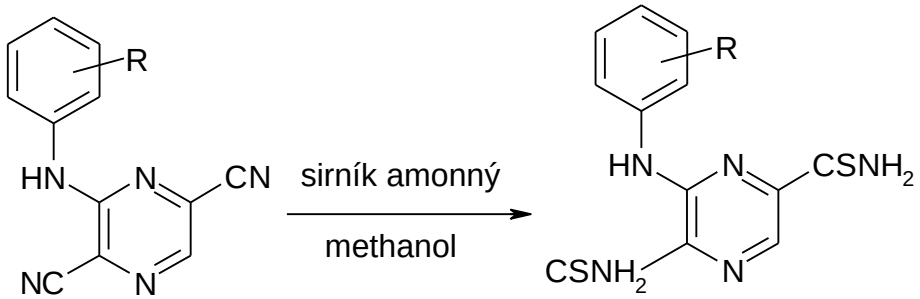
PŘÍPRAVA FUNKČNÍCH DERIVÁTŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN



Substituovaný 3-arylamino-5-kyanpyrazin-2-karboxamid (1 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (50 ml), byl přidán nasycený vodný roztok sirníku amonného a směs byla ponechána přes noc v mrazničce. Směs se zfiltrovala, rozpouštědlo se odstranilo na vakuové odparce a surový produkt se překrystalizoval z vody s trochou aktivního uhlí.



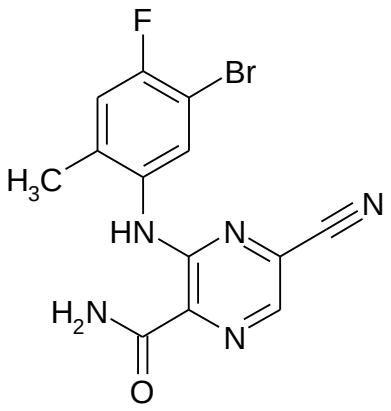
Substituovaný 3-arylamino-5-kyanpyrazin-2-karboxamid (2 mmol) byl rozpuštěn s fosforoxychloridem (2 ml) a zahříván při 90 °C. Směs se při této teplotě udržovala po dobu jedné hodiny. Poté se nechala zchladnout a po kapkách se nalévala na drobné kusy ledu nepřesahující teplotu 5 °C . Vodný roztok se extrahoval chloroformem a rozpouštědlo se odstranilo přes síran hořečnatý a páru ve vakuu. Čistá sloučenina se překrystalizovala ze směsi voda/ethanol.



Substituovaný 3-arylaminopyrazin-2,5-dikarbonitril (1 mmol)
byl rozpuštěn v methanolu (50 ml). Přidal se nasycený vodný roztok sirníku amonného (1 ml) a výsledná směs se nechala vařit pod zpětným chladičem celou noc. Směs se zfiltrovala, rozpouštědlo se odstranilo destilací na vakuové odparce a produkt se překrystalizoval z vody s trochou aktivního uhlí.

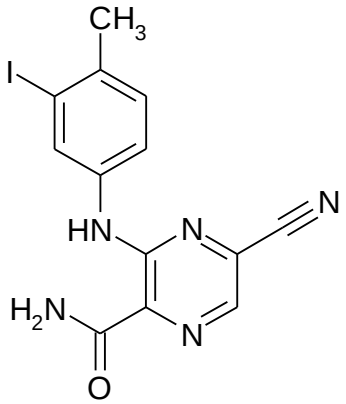
3.3 NOVĚ PŘIPRAVENÉ DERIVÁTY PYRAZINKARBOXYLOVÉ KYSELINY

3.3.1 3-(5-brom-4-fluor-2-methylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid



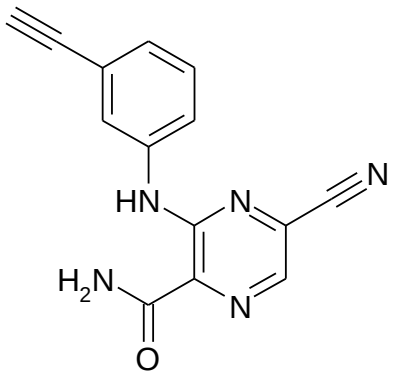
Sumární vzorec	**$C_{13}H_9BrFN_5O$**
Výtěžek	64,95 % (1,134 g)
M.h.	350,15
Tt	235-238°C
Rf	0,83
Čistota [%]	95,94
Elementární analýza	Vypočteno: C 44,59 %; H 2,59 %; Br 22,82 %; F 5,43 %; N 20,00 %; O 4,57 % Naměřeno: C 45,44 %; H 3,08 %; N 19,55 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3225 (NH), 3154 (CH_3), 2360 (CN) 1690 (C=O), 1612 (fenyl), 1575 (NH), 1397, 1272, 1194 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	11,38 (s, 1H pyrazin), 8,67 (s, NH_2), 8,53 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 7,81 (d, 1 H), 7,38 (d, 1H), 4,20 (CH_3).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	167,41; 156,23; 155,18; 139,64; 136,11; 132,58; 131,29; 129,33; 118,87; 116,87; 115,21; 105,87 a 26,97.

3.3.2 5-kyan-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid



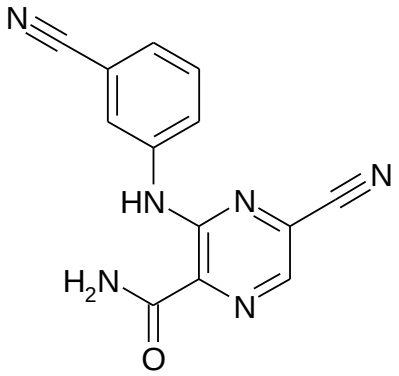
Sumární vzorec	**$C_{13}H_{10}IN_5O$**
Výtěžek	49,32 % (0,667 g)
M.h.	379,16
Tt	220-225°C
Rf	0,84
Čistota [%]	97,59
Elementární analýza	Vypočteno: C 41,18 %; H 2,66 %; I 33,47 %; N 18,47 %; O 4,22 % Naměřeno: C 40,91 %; H 2,72 %; N 18,62 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3239 (NH), 3138 (CH_3), 2366 (CN) 1682 (C=O), 1610 (fenyl), 1575 (NH), 1410, 1346, 1272, 1184 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	11,36 (s, 1H pyrazin), 8,57 (s, NH_2), 8,51 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 7,68 (d, 1 H), 7,28 (d, 1H), 4,18 (CH_3).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	166,51; 156,54; 154,05; 139,38; 137,39; 131,99; 131,13; 128,63; 118,97; 117,13; 114,22; 106,37 a 24,68.

3.3.3 5-kyan-3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid



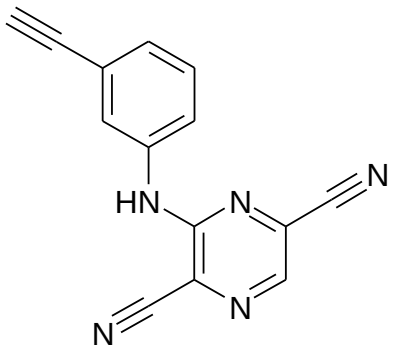
Sumární vzorec	**$C_{14}H_9N_5O$**
Výtěžek	53,79 % (0,739 g)
M.h.	263,26
Tt	235-237°C
Rf	0,82
Čistota [%]	59,01
Elementární analýza	Vypočteno: C 63,87 %; H 3,45 %; N 26,60 %; O 6,08 % Naměřeno (1): C 63,14 %; H 3,75 %; N 26,12 % Naměřeno (2): C 62,57 %; H 3,65 %; N 26,03 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3294 (NH), 3154 (CCH), 2300 (CN) 1682 (C=O), 1608 (fenyl), 1589 (NH), 1431, 1271, 1190 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,17 (1H pyrazin), 8,61 (NH_2), 8,16 (s, 1H), 7,62 - 7,23 (m, 4H), 4,20 (CCH), 4,14 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	167,54; 150,85; 138,55; 135,84; 131,53; 129,70; 128,59; 126,98; 123,05; 122,51; 121,17; 116,16; 83,47 a 81,11.

3.3.4 5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid



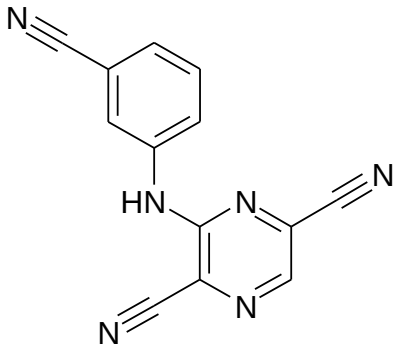
Sumární vzorec	**$C_{13}H_8N_6O$**
Výtěžek	39,71 % (0,550 g)
M.h.	264,25
Tt	258-260 °C
Rf	0,79
Čistota [%]	99,84
Elementární analýza	Vypočteno: C 59,09 %; H 3,05 %; N 31,80 %; O 6,05 % Naměřeno: C 59,26 %; H 3,47 %; N 30,57 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3213 (NH), 2228 (CN) 1698 (C=O), 1644 (fenyl), 1575 (NH), 1438, 1275, 1188 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,22 (1H pyrazin), 8,70 (NH_2), 8,05 (s, 1H), 7,81 - 7,33 (m, 4H), 4,15 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	167,44; 151,25; 138,57; 134,94; 130,98; 128,72; 128,39; 126,98; 123,03; 121,51; 120,57; 118,57; 116,14 a 112,13.

3.3.5 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril



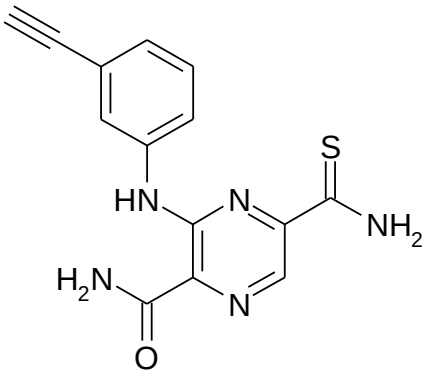
Sumární vzorec	$C_{14}H_7N_5$
Výtěžek	65,75 % (0,254 g)
M.h.	245,25
Tt	191-193 °C
Rf	0,83
Čistota [%]	91,26
Elementární analýza	Vypočteno: C 68,57 %; H 2,88 %; N 28,56 % Naměřeno: C 61,07 %; H 3,58 %; N 24,73 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3344 (NH), 2235 (CN) 1684 (C=O), 1614 (fenyl), 1571 (NH), 1374, 1267, 1198 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,24 (1H pyrazin), 8,70 (s, 1H), 7,98 - 7,60 (m, 3H), 4,20 (CCH), 4,14 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	162,54; 140,85; 138,71; 130,85; 129,33; 128,70; 128,29; 127,18; 123,05; 122,51; 121,17; 116,16; 82,17 a 81,54.

3.3.6 3-(3-kyanofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril



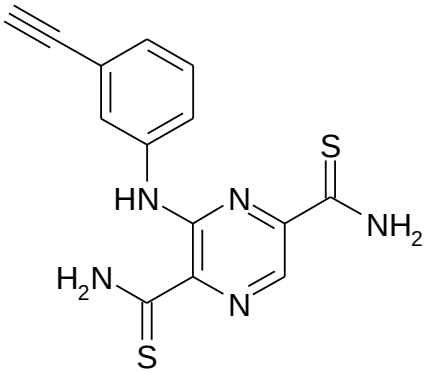
Sumární vzorec	**$C_{13}H_6N_6$**
Výtěžek	20,70 % (0,077 g)
M.h.	246,23
Tt	236-238°C
Rf	0,91
Čistota [%]	97,57
Elementární analýza	Vypočteno: C 63,41 %; H 2,46 %; N 34,13 % Naměřeno: C 63,41 %; H 2,85 %; N 32,90 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3342 (NH), 2361, 2344, 2232 (CN) 1600 (C=O), 1568 (fenyl), 1538 (NH), 1418, 1365, 1254, 1199 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,25 (1H pyrazin), 8,71 (s, 1H), 7,98 - 7,60 (m, 3H), 4,15 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	152,35; 139,02; 138,74; 130,36; 129,12; 128,21; 127,09; 125,29; 119,87; 118,77; 115,58; 114,73 a 111,69.

3.3.7 5-karbamothioyl-3(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid



Sumární vzorec	**$C_{14}H_{11}N_5OS$**
Výtěžek	84,20 % (0,097 g)
M.h.	297,34
Tt	212-214 °C
Rf	0,98
Čistota [%]	96,81
Elementární analýza	Vypočteno: C 56,55 %; H 3,73 %; N 23,55 %; O 5,38 %; S 10,78 % Naměřeno: C 56,96 %; H 3,60 %; N 22,72 %; S 9,10 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3284 (NH), 2926 (CCH), 1674 (C=O), 1608 (fenyl), 1573 (NH), 1414, 1388, 1264, 1194 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	11,44 (1H pyrazin), 10,40 ($CSNH_2$), 9,58 ($CONH_2$) 8,75 (s, 1H), 8,58 - 7,18 (m, 3H), 4,18 (CCH), 4,16 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	194,06; 168,21; 149,48; 148,15; 139,15; 132,36; 129,63; 128,93; 126,40; 122,96; 122,47; 121,05; 83,65 a 80,87.

3.3.8 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-bis(karbothioamid)



Sumární vzorec	**$C_{14}H_{11}N_5S_2$**
Výtěžek	35,46 % (0,045 g)
M.h.	313,40
Tt	298-301 °C
Rf	0,97
Čistota [%]	87,10
Elementární analýza	Vypočteno: C, 53.65; H, 3.54; N, 22.35; S, 20.46 Naměřeno: C 52,51 %; H 3,02 %; N 20,36 %; S 15,67 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3278 (NH), 2924 (CH_3), 2360, 2233 (CN, nečistota?) 1670 (C=O), 1607 (fenyl), 1574 (NH), 1418, 1267, 1177 (pyrazin).
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	11,64 (1H pyrazin), 10,42 ($CSNH_2$), 10,28 ($CSNH_2$) 8,65 (s, 1H), 8,68 - 7,22 (m, 3H), 4,20 (CCH), 4,15 (NH).
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, [δ]	182,26; 156,25; 149,38; 146,11; 138,97; 133,02; 129,14; 128,65; 126,87; 122,57; 122,13; 121,65; 82,95 a 81,14.

4 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

4.1 ANTITUBERKUKOLICKÁ AKTIVITA

Hodnocení antimykobakteriální aktivity

Testování antituberkulotické aktivity nově syntetizovaných derivátů pyrazinu prováděla MUDr. Michaela Svobodová z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Látky byly testovány in vitro na účinnost proti M. tuberculosis H37Rv, M. avium No. 152/73, M. avium No. 80/72 a M. kansasii PKG 8 na tekuté Šulově půdě zřeďovací metodou ve srovnání s pyrazinamidem při pH 5,4. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu v koncentracích 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 a 2 μg/ml. Výsledky byly odečítány po dvou a třech týdnech. Aktivita PZA se liší in vitro v závislosti na kyselosti půdy, na jejím složení i velikosti inokula. Hodnoty MIC pro PZA se v literatuře pohybují v rozmezí od 6,25 do 50 μg/ml [38], [39].

Sloučenina	MIC [mg·l $^{-1}$] ([μmol·l $^{-1}$])			
	M. tuberculosis H37 Rv	*M. avium 80*	*M. avium 152*	*M. kansasii*
PZA	16 mg/l	>256 mg/l	>256 mg/l	>128 mg/l
1	>128 mg/l	>128 mg/l	>128 mg/l	>128 mg/l
2	>128 mg/l	>128 mg/l	>128 mg/l	>128 mg/l
3	32 mg/l	128 mg/l	128 mg/l	>128 mg/l
4	16 mg/l	32 mg/l	64 mg/l	>128 mg/l
5	32 mg/l	64 mg/l	64 mg/l	>128 mg/l
6	32 mg/l	64 mg/l	64 mg/l	>128 mg/l
7	256 mg/l	256 mg/l	256 mg/l	>128 mg/l
8	256 mg/l	>256 mg/l	>256 mg/l	>128 mg/l

4.2 ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA

Antifungální hodnocení

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány in vitro na antifungální aktivitu na KBLV FaF UK v Hradci Králové Mgr. Marcelou Vejsovou a paní Idou Dufkovou se spolupracovníky.

Připravené sloučeniny byly zkoušeny in vitro na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody [40], [41]. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufrovaný na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (Sigma). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0.975 μM. Součástí testování byly jednak slepé pokusy (bez účinné látky), jednak určení aktivity standardu (ketokonazol) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35 °C. V případě **Trichophyton mentagrophytes** byly MIC zaznamenány po 48 a 72 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti **Candida albicans ATCC 44859**, **C. tropicalis 156**, **C. krusei E28**, **C. glabrata 20/I**, **Trichosporon ashaii 1188**, **Trichophyton mentagrophytes 445**, **Aspergillus fumigatus 231** a **Absidia corymbifera 272**.

Tabulka hodnot MIC/IC_{80} standardu ketokonazolu

Testované kmeny	MIC/IC_{80} (μmol.l^{-1})							
	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC	TM
Délka inkubace	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h
ketokonazol (standard)	0,24	1,95	0,98	0,49	0,24	7,81	31,25	0,98

KMEN (kód)		**TESTOVANÁ LÁTKA** (kód) –**MIC/IC$_{80}$** (µmol.l^{-1})							
		1	2	3	4	5	6	7	8
CA	24h	>125	*	**62,5**	>500	**250**	>250	**250**	**15,62**
	48h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	**31,25**
CT	24h	>125	*	**31,25**	>500	125	**250**	**250**	>250
	48h	>125	*	**62,5**	>500	>250	>250	**250**	>250
CK	24h	>125	*	**62,5**	>500	125	>250	**250**	>250
	48h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	>250
CG	24h	>125	*	**15,62**	>500	125	**250**	**62,5**	>250
	48h	>125	*	**62,5**	>500	>250	>250	**125**	>250
TA	24h	>125	*	**31,25**	>500	125	>250	**125**	**31,25**
	48h	>125	*	**125**	>500	>250	>250	**125**	**62,5**
AF	24h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	**250**
	48h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	>250
AC	24h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	**250**
	48h	>125	*	>125	>500	>250	>250	**250**	>250
(tm)	72h	>125	*	**31,25**	>500	>250	>250	**31,25**	**62,5**
	120h	>125	*	**125**	>500	>250	>250	**125**	**250**

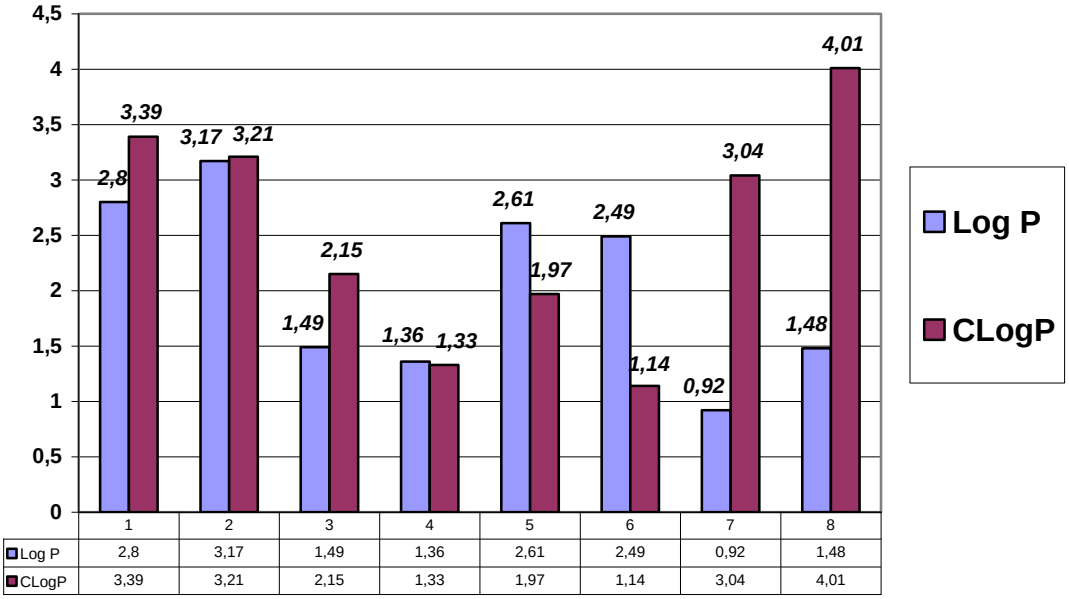
* výsledky budou doplněny v rigorózní práci
poznámka: **tučně** vyznačené hodnoty MIC /IC$_{80}$ (µmol.l-^{1}) se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací

5 DISKUZE

Syntézou osmi nových, v literatuře dosud nepopsaných, sloučenin jsem přispěla dalším dílem do mozaiky výzkumu Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.
Látky odvozené od pyrazinkarboxylové kyseliny (karbonitrily, amidy, thioamidy) byly připraveny na sebe navazujícími reakcemi. A to halogenací pyrazinového jádra působením $POCl_3$ (fosforchloridu) za odštěpení molekuly vody (dehydratace), amidací za pomoci formamidu ($HCONH_2$) a persíranu amonného ($(NH_4)_2S_2O_8$),
aminodehalogenací dochází k navázání arylu na pyrazinové jádro a k odštěpení kyseliny chlorovodíkové díky působení pyridinu. V přípravě funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny se jedná o chemickou syntézu za použití činidla a) (sirníku amonného v prostředí methanolu) za vzniku karboxamidů a karbothioamidů a činidla b) (fosforoxychloridu) za vzniku dikarbonitrilů. Použití činidla c) (Lawessonova činidla) je pro získání karbothioamidů také možné, avšak já jsem tento krok neprováděla.

Syntézy probíhaly vcelku hladce, výtěžky se pohybují od 20,7 % do 84,2 %.
Získané látky byly charakterizovány teplotou tání, TLC, IČ spektry, 1H a 13C NMR spektery a elementární analýzou. Čistota substancí se odvíjí od přečištění rekrystalizací ze směsi voda/ethanol s aktivním uhlím.

Dále byly u látek zjištěny hodnoty lipofility ClogP a log P pomocí programu CS ChemOffice Ultra, verze 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Hodnota ClogP je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě n-oktanol/voda, při jehož výpočtu jsou brány v úvahu možné chemické interakce. Hodnota log P je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě n-oktanol/voda. Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí C log P od1,14 do 4,01 a log P od 0,92 do 3,17.
Vyšší lipofilitu vykazují sloučeniny s halogeny substituovaným anilinem a díky tomu mají i vyšší molekulovou hmotnost. Předpokládá se, že dostatečná lipofilita je jednou z důležitých a základních podmínek pro průnik přes vysoce lipofilní mykobakteriální stěnu. Výsledky lipofility se v mém případě nepohybují v záporných hodnotách, které odpovídají hydrofilní struktuře.



	1	2	3	4	5	6	7	8
Log P	2,8	3,17	1,49	1,36	2,61	2,49	0,92	1,48
CLogP	3,39	3,21	2,15	1,33	1,97	1,14	3,04	4,01

Byly určeny hodnoty kapacitního faktoru K za použití HPLC Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corporation, Milford, MA, U.S.A.). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu p.a. (70 %) a vody (30 %). Detekce probíhala spektrofotometricky při 210 nm. Byl změřen retenční čas TR (vzdálenost od nástřiku k maximu píku) a mrtvý retenční čas TD (vzdálenost od nástřiku k maximu píku neadsorbované látky; použit roztok KI v methanolu). Kapacitní faktor byl spočítán použitím programu Millennium 32R podle vzorce:

$$K = (TR - TD) / TD$$

Log K je pak spočítán z kapacitního faktoru K a je použit jako index lipofility.

Vypočítané hodnoty lipofility (log P) a chromatograficky stanovené hodnoty log K

Sloučenina	log P	log K
1	2,80	0,8870
2	3,17	1,0056
3	1,49	0,6318
4	1,36	0,5303
5	2,61	-
6	2,49	-
7	0,92	0,6945
8	1,48	-

Všechny finální látky byly otestovány na antimykobakteriální aktivitu MUDr. Michaelou Svobodovou z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Sloučeniny byly testovány in vitro na účinnost proti M. tuberculosis H37Rv, M. avium No. 152/73, M. avium No. 80/72 a M. kansasii PKG 8 na tekuté Šulově půdě zřeďovací metodou ve srovnání s pyrazinamidem při pH 5,4. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu v koncentracích 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 a 2 μg/ml. Výsledky byly odečítány po dvou a třech týdnech. Aktivita PZA se liší in vitro v závislosti na kyselosti půdy, na jejím složení i velikosti inokula. Hodnoty MIC pro PZA se v literatuře pohybují v rozmezí od 6,25 do 50 μg/ml.

Nejlepší aktivitu:

- proti M. tuberculosis H37Rv vykazuje látka číslo 4 (5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid) s hodnotou 16 mg/l

- proti M. avium No. 152/73 vykazuje látka číslo 4 (5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid) s hodnotou 32 mg/l

- proti M. avium No. 80/72 vykazují látky 4 (5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid), 5 (3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril), 6 (3-(3-kyanofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril) s hodnotou 64 mg/l

- proti M. kansasii PKG 8 vykazují všechny látky stejnou hodnotu a to >128 mg/l.

Vzorky nasyntetizovaných sloučenin byly také odeslány na ústav TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility), USA. Výsledky nejsou zatím známy, budou součástí navazující rigorózní práce v příštím roce.

Další zjišťovanou hodnotou byl průkaz antifungální aktivity pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufrovaný na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (Sigma). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0.975 μM. Součástí testování byly jednak slepé pokusy (bez účinné látky), jednak určení aktivity standardu (ketokonazol) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35 °C. V případě Trichophyton mentagrophytes byly MIC zaznamenány po 48 a 72 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti Candida albicans ATCC 44859, C. tropicalis 156, C. krusei E28, C. glabrata 20/I, Trichosporon ashaii 1188, Trichophyton mentagrophytes 445, Aspergillus fumigatus 231 a Absidia corymbifera 272.
Výsledky přinesly poznání nejlepších hodnot MIC/IC80 ($\mu mol.l^{-1}$) v hodnotě od 15,62 do 250 a to u sloučenin **3, 7, 8.**
Všechny údaje jsou uvedené v průběhu diplomové práce.

V akademickém roce 2006/2007 jsem se zúčastnila Studentské vědecké konference (SVK) s prezentací části diplomové práce v chemické sekci. Postoupila jsem do Nadnárodního kola SVK pořádaného v Praze společností Zentiva a.s. Svoji účast na těchto akcích hodnotím jako velmi přínosnou pro moji další profesní orientaci.

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsem plnila následující úkoly:

A. S použitím dostupné odborné literatury a internetu jsem provedla rešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě a trendy v terapii.

B. V dostupné chemické literatuře jsem zjistila metody přípravy derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny

C. Připravila jsem tyto v literatuře dosud nepopsané sloučeniny:

1. 3-(5-brom-4-fluor-2-methylfenylamino)-5-kyanpyrazin-2-karboxamid
2. 5-kyan-3-(3-jod-4-methylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid
3. 5-kyan-3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid
4. 5-kyan-3-(3-kyanfenylamino)pyrazin-2-karboxamid
5. 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
6. 3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
7. 3-(3-kyanofenylamino)pyrazin-2,5-dikarbonitril
8. 5-karbamothioyl-3-(3-ethynylfenylamino)pyrazin-2-karboxamid

Výše uvedené látky jsou charakterizovány teplotou tání, elementární analýzou, IČ spektry, 1H a 13C NMR spektry.

D. Série látek jsem podrobila in vitro biologickému hodnocení:
Získala jsem údaje o antimykobakteriální aktivitě a antimykotické aktivitě.

E. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log P a ClogP nově připravených látek: log P připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 0,92 – 3,17 a ClogP v rozmezí 1,14 – 4,01.

F. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (výsledky jsou uvedeny v diskuzi).

LITERATURA

[1] KOUKAL, M. *Tuberkulóza – hrozba, nebo zapomenutá minulost?* [online], [cit. 19.11.2004] Dostupné na WWW: < http://www.21stoleti.cz>

[2] SALAJKA, F., PARÁKOVÁ, Z., PRCHALOVÁ, E. *Aktuality oboru TRN.* Hradec Králové 2007

[3] SCHOTT, H. *Kronika medicíny.* Fortuna Print, Praha 1994. ISBN 80-85873-16-8.

[4] Solutio, *Tuberkulóza.* [online], Solutio 2000/2001, [cit. 19.11.2007] Dostupné na WWW: <http://medon-solutio.cz>

[5] *Anti-tuberculosis Drug Resistance in the World: Fourth Global Report.* Geneva, World Health Organization, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.394), [online] [cit. 3.2.2008] Dostupné na WWW: < http://www.who.int/tb/publications/2008/en /index.html>

[6] *2007 AIDS epidemic update.* Geneva, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and WHO, 2007 (UNAIDS/07.27E/JC1322E). [online] [cit. 11.1.2008] Dostupné na WWW: < http:// www.unaids.org/en/HIV_data/2007EpiUpdate/default.asp >

[7] *Interim policy on collaborative TB/HIV activities.* Geneva, World Health Organization, 2004 (WHO/HTM/TB/2004.330; WHO/HTM/HIV/2004.1). [online] [cit. 11.1.2008] Dostupné na WWW: < http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/who_htm_tb_ 2004. 330.pdf>

[8] VINŠOVÁ, J., IMRAMOVSKÝ, A., et al. *Recent Advances on Isoniazide Derivates*. Anti-Ifective Agents in Medicinal Chemistry, 2008, 7, 12-31, Bentham Science Publishers Ltd. 2008

[9] *Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí*. [online], [cit. 5.2. 2008] Dostupné na WWW: <http://www.fnspo.cz/kliniky/trn/tuberkuloza.html>

[10] SCHETTLER G.: *Repetitorium praktického lékaře*. Galén 1995

[11] *Očkování proti tuberkulóze (TBC)*. [online], [cit. 19. října 2007] Dostupné na WWW: <http://www.vakciny.net/pravidelne_ockovani/TBC.htm>

[12] *Surveillance programy vybraných nákaz*. Praha 2006, Státní zdravotní ústav, ISSN 0231-6544, Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, číslo 6/2006, [online], [cit. 27. 11. 2007] Dostupné na WWW: < http://www1.szu.cz/svi/ahem/obsah-2006-06.html >

[13] MAČÁK, J, MAČÁKOVÁ, J. *Patologie.* Grada, Praha 2004. ISBN 80-247-0785-3

[14] OŠŤÁDAL, O., KOS, S. *Tuberkulóza dospělých, Standard lékařské péče CLK001 LP*. [online], [cit. 5.2. 2008] Dostupné na WWW: <http://www.fnspo.cz/kliniky/trn/ tuberkuloza.html>

[15] KOLEK, V. *„Zdravý český rozum“ a BCG revakcinace*. Medical Tribune, 29/2007, [online], [cit. 29.9. 2007] Dostupné na WWW: <http://www.medical-tribune.cz/archiv/ mtr/164/4560>

[16] Extensively drug-resistant tuberculosis [online], Wikipedia, the free encyclopedia, [cit. 12.11.2007] Dostupné na WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Extensively_drug-resistant_ tuberculosis>

[17] *The Global MDR-TB and XDR-TB response plan 2007-2008*. Geneva, World Health Organization, 2007 (WHO/HTM/TB/2007.387), [online], [cit. 18. 4. 2008] Dostupné na WWW: < http://www.who.int/tb/publications/2007/en/index.html>

[18] *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. Geneva, World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/TB/2006.361), [online] [cit. 11.1.2008] Dostupné na WWW: < http://www.who.int/tb/publications/2006/who_htm_tb_2006_361/ en/index.html>

[19] DOLEŽAL, M. *Biologicky aktivní pyraziny přírodního a syntetického původu*. 2006, Chemické listy 11/2006, 959-966, [online], [cit. 14.3. 2008] Dostupné na WWW: <www.vscht.cz/chem_listy/liblice/2004-1001-1050.pdf >

[20] KLEIN, B., HETMAN, N., E., O´DONNELL, M., E., Pyrazines. III. The Action of Phosphoroyl Chloride on Pyrazine N-Oxides. *The Journal of Organic Chemistry*, 1963, vol. 28, p 1682 – 1686, ISSN: Online 1520-6904, Print 0022-3263

[21] KLUSOŇOVÁ, P. *Deriváty Pyrazinu jako potenciální léčiva I.* Unpublished Master Thesis, FF UKHK, 2007.

[22] PALEK, L., DVOŘÁK, J., SVOBODOVÁ, M., BUCHTA, V., JAMPÍLEK, J., DOLEŽAL, M. *Synthesis, Antimycobacterial and Antifungal Evaluation of 3-Arylaminopyrazine-2,5-dicarbonitriles*. Archiv der Pharmazie 341 (1), 61-65 (2008), Current Organic Chemistry, 2005, 9, 49-60

[23] MIXAN, C.E., PEWS, R.G. *Selective N-oxidations of chlorinated pyrazines and quinoxalines* . J. Org. Chem.; 1977; 42(11) pp 1869 - 1871; [online], [cit. 17.1. 2008] Dostupné na WWW: < http://pubs.acs.org/cgi- bin/archive.cgi/joceah/1977/42/i11/pdf/ jo00431a010.pdf >

[24] DLABAL K.,PALÁT K., LYCKA A., ODLEROVÁ Z. Synthesis and 1H and 13C NMR spectra of sulfur derivatives of pyrazine derived from amidation product of 2-chloropyrazine and 6-chloro-2-pyrazinecarbonitrile. Tuberculostatic activity.“, 1990, 55, 2493-2501, Collect. Czech. Commun.

[25] DOLEŽAL, M., MONKS, K., PLASOVÁ, P, VINŠOVÁ, J., JAMPÍLEK, J., SVOBODOVÁ, M., BUCHTA, V. *Synthesis, antifungal and antimycobacterial properties of pyrazinamide analogues.* Abstracts from the Austrian, German, Hungarian, Italian, Polish and Slovenian 5th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, June 17-21, 2007, Portorož, Slovenia, PO031; In Farm. Vestn. 58, 85 (2007).

[26] SHI, R., ITAGAKI, N., SUGAWARA, I. *Overview of Anti-Tuberculosis Drugs and Their Resistance Mechanisms.* Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2007, 7, 1177-1185, Bentham Science Publishers Ltd. 2007

[27] BARRY, P.J., O´CONNOR, T.M. *Novel Agents in the Management of Mycobacterium Tuberculosis Disease.* Current Medicinal Chemistry, 2007, 14, 2000-2008, Bentham Science Publishers Ltd. 2007, [online], [cit. 4.1. 2008] Dostupné na WWW: <http://www.newtbrx.org /literature/index.cfm?fuseaction=throwpub&id=329 >

[28] TRIPATHI, R., P., TEWARI, N., DWIVEDI, N., TIWARI, V., K., Fighting Tuberculosis: An Old Disease with New Challenges. *Medicinal Research Reviews*, 2005, vol. 25, no 1, ©2004 Wiley Periodicals, Inc, p 93-131, ISSN 0198-1128

[29] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H., *Základní a aplikovaná farmakologie.* Galén, Karolinum, Praha 2005, 601 stran, ISBN: 80-7262-168-8 (Galén), ISBN: 80-246-0539-4

[30] VINÍCIUS, M., DE SOUZA, N. *Promising Drugs Against Tuberculosis*. 2006, Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, Vol 1., Number 1.

[31] ZHANG, Y., WADE, M., M., SCORPIO, A., ZHANG, H., SUN, Z., Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. October 2003, vol. 52, p.790-795. ISSN: Online 1460-2091, Print 0305-7453

[32] ZHANG, Y., POST-MARTENS, K., DENKIN, S., New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. Drug Discovery Today. January 2006, vol. 11, no. 1/2. p 21-27. ISSN: 1359-64463

[33] JULÁK, J., Mikrobiologie 1 (přednáška). [online], 1. Lékařská fakulta Karlovy Univerzity. 2004, [cit. 10. ledna 2008] Dostupné na WWW: <http://lf1.cz/upload/tbc.doc>

[34] HAMPL, F., PALEČEK J. *Farmakochemie 1.vyd.* Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2002, ISBN 80-7080-495-5

[35] GORE, S. *Capreomycin*. Unpublished Paper. [online], [cit. 17.1. 2008] Dostupné na WWW: <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/gore/index.html>

[36] PHETSUKSIRI, B., et al. *Unique mechanism of action of the Thiourea drug, isoxyl, on Mycobacterium tuberculosis.* 2003, J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 52, 53123-53130.

[37] NUNN, P., PORTER, J., WINSTANLEY, P. *Thiacetazone—avoid like poison or use with care?* (1993). Trans R Soc Trop Med Hyg 87 (5): 578–82.

[38] McDERMOTT W., TOMPSETT R. *Activation of pyrazinamide and nicotinamide in acidic environments in vitro.*1954, Am. Rev. Tuberc. 70, 748.

[39] HAVEL A., MORÁVEK J., SOJKOVÁ M., URBANČÍK R. Sborník V. bakteriologického semináře „Aktuální otázky bakteriologie tuberkulózy“, 1964, s. 28.

[40] VILLANOVA P.A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeats : Proposed Standard. NCCLS Document M 27-P, 1992.

[41] SHEENAN, D.J., ESPINEL-INGROFF A., STEELE MOORE, L., WEBB, C.D. *Clin. Infect. Dis.* 1993, *17*, 494.