

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika  
(RIGORÓZNÍ PRÁCE)**

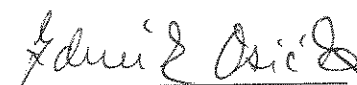
**Hradec Králové, květen 2009**

**Mgr. Zdeněk Osička**

Děkuji Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph. D. za cenné rady, pomoc a trpělivost při vzniku této rigorózní práce. Dále děkuji všem ostatním pracovníkům fakulty, kteří se na vzniku této práce jakkoliv podíleli.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování rigorózní práce čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Datum: 28. V. 2009



Mgr. Zdeněk Osíčka

## Obsah

CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE .....	5
1. ÚVODNÍ ČÁST .....	6
1.1. Tuberkulóza .....	6
Historie .....	6
Současný stav .....	6
Současná epidemiologická situace v České republice .....	7
1.2. Mykobakterie .....	8
1.3. Tuberkulóza .....	13
Epidemiologie .....	13
Patogeneze onemocnění .....	13
Tuberkulóza osob s oslabenou imunitou .....	14
1.4. Mykobakteriózy .....	16
1.5. Antimykobakteriální léčiva .....	17
1.5.1. Chemické struktury a mechanismy účinku antimykobakteriálních léčiv: .....	17
1.5.2. Nová léčiva ve fázi klinického hodnocení .....	27
1.6. Terapie mykobakteriálních infekcí .....	31
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	32
2.1. Vybrané chemické vlastnosti pyrazinu .....	32
2.2. Příprava <i>N</i> -oxidů pyrazinu .....	33
2.3. Halogenace pyrazinového jádra .....	34
2.3. Radikálové reakce na pyrazinovém jádře .....	35
2.4. Příprava amidů karboxylových kyselin .....	35
2.4.1. Aminolýza esterů karboxylových kyselin .....	36
2.4.2. Aminolýza anhydridů karboxylových kyselin .....	36
2.4.3. Aminolýza acylchloridů karboxylových kyselin .....	37
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
3.1. Přístroje a chemikálie .....	38
3.2. Schéma prováděných reakcí .....	39
3.3. Obecný postup přípravy heterocyklických amidů pyrazin 2-karboxylové kyseliny .....	40
3.3.1. Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	40
3.3.2. Příprava anlidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	40
3.4. Charakteristiky jednotlivých připravených látek .....	41
3.4.1. (4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	41
3.4.2. (3-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	45
3.4.3. (3-chlorfenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	49
3.4.4. (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	53
3.4.5. (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	57
3.4.6. (2,6-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	61
3.4.7. (2,6-dichlorfenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	65
3.4.8. (2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	69
3.4.9. (2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	73



3.4.10. (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	77
3.4.11. (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	81
4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ .....	85
4.1. Antifungální aktivita .....	85
4.2. Antimykobakteriální aktivita .....	87
4.3. Antialgální aktivita.....	88
Inhibice vývoje kyslíku v chloroplastech .....	88
Testování redukce obsahu chlorofylu v <i>Chlorella vulgaris</i> .....	88
5. DISKUSE.....	90
6. ZÁVĚR .....	95
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	97

## CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antifungálním a antimykobakteriálním účinkem. Doplňkově je u nově připravených látek zjišťována schopnost inhibovat fotosyntézu. Tato rigorózní práce je dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry.

Cílem rigorózní práce je pokusit se připravit biologicky aktivní (tj. antifungálně a především antimykobakteriálně) deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny. Tato práce navazuje na výsledky prezentované na *X. studentské vědecké konferenci* (fakultní kolo) 2002. Příprava látek prezentovaných na této konferenci a jejich biologická hodnocení jsou zveřejněna v časopise *IL FARMACO*<sup>1</sup>. Dále navazuje na moji diplomovou práci<sup>2</sup>, květen 2003, jejíž výsledky byly zveřejněny formou plakátového sdělení na *XXXI. konferenci „Syntéza a analýza léčiv“* v Bratislavě<sup>3</sup> (září, 2002), na *XXXII. konferenci „Syntéza a analýza léčiv“* ve Velkých Karlovicích<sup>4</sup> (září, 2003) a v rámci elektronické konference<sup>5</sup> *ECSOC-7* (listopad, 2003).

### Konkrétními úkoly bylo:

1. Provést rešerši zaměřenou především na současný význam tuberkulózy ve světě a trendy v terapii.
2. V dostupné chemické literatuře zjistit metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravit 2 nové série anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny a 2 série těchto látek dokončit.
4. Připravené látky podrobit testům biologické (zejména antifungální, antimykobakteriální) aktivity.
5. Vypočítat log *P* nově připravených derivátů.
6. Zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou (antimykobakteriální, antifungální a antialgální aktivita) a lipofilitou v sérii připravených látek.

# 1. ÚVODNÍ ČÁST

## 1.1. Tuberkulóza

### Historie

Důkaz, že tuberkulóza (TBC) existovala již v pradávných časech, nám potvrzují tuberkulózní změny objevené ve staroegyptských a peruánských mumiiích. Nemoc byla dobře známá i starověkým lékařům; termín hemoptýza, charakterizující průběh choroby, zavedl do medicíny již Hippokrates (4. st. př. n. l.). Galén (2. st.n. l.) zase uvažuje nad původem „souchotin plicních“ a doporučuje léčení dietou. Termín *tuberculum* užil poprvé Silvius v 16. st. n. l.<sup>6</sup>

V 19. st. a první polovině 20. st. epidemie TBC udeřila ve většině zemí Evropy. Stala se tak největším sociálně – společenským problémem své doby, hlavně díky vysoké prevalenci a obrovskému počtu úmrtí (především dětí a mladých lidí). Tuberkulózu trpělo též mnoho slavných lidí m.j.: Chopin, Goethe, Čechov, Paganini, Wolker<sup>6</sup>.

### Současný stav

Od doby, kdy Robert Koch informoval o objevu původce TBC na sjezdu fyziologů v Berlíně, uplynulo více jak 120 let. Za tu dobu došlo k velkému pokroku v léčbě TBC; zdokonalily se diagnostické metody, byla objevena spousta účinných léčiv i očkovaní. Přesto si TBC vyžádá ročně 4 mil. obětí. Infikována je 1/3 populace. Roční přírůstek nových případů se odhaduje na 8-9 mil., přičemž 5 mil. onemocnění z tohoto počtu je potvrzeno laboratorně, a pouze 2,5 mil. se dostane odpovídající léčba<sup>6</sup>. Tato čísla se týkají především rozvojových zemí, coby výslednice nevědomosti a chudoby. Vyspělé průmyslové státy pak musí čelit TBC hlavně kvůli rostoucí migraci z těchto zemí. Společným celosvětovým problémem je stoupající výskyt kmenů rezistentních na dosud používané tradiční látky a HIV-infikovaní, u kterých se TBC často vyskytuje<sup>7</sup>. Světová zdravotnická organizace upozornila počátkem září roku 2006 na narůstající problém rezistence u původce tuberkulózy *Mycobacterium tuberculosis*. Zdaleka nejde jen o rezistenci k jednomu typu antibiotika. Světová zdravotnická organizace registruje ročně 450 tisíc případů nákazy kmeny, které jsou označovány jako multirezistentní (MDR – *Multidrug Resistant* ). Do této kategorie patří bakterie odolávající dvěma hlavním antibiotikům „první linie“ – isoniazidu a rifampicinu. Stále častěji se ale

objevují kmeny s ještě komplexnější rezistencí. Světová zdravotnická organizace pro ně zavedla označení „extrémně rezistentní“ (XDR – *Extreme Drug Resistant*). Ty jsou definovány jako kmeny, které splňují kritérium pro MDR a jsou navíc rezistentní k alespoň třem ze šesti skupin antibiotik využívaných k léčbě tuberkulózy v „druhé linii“. V mnoha případech se ukazují infekce XDR kmeny jako nevléčitelné<sup>8</sup>.

Epidemiologickou situaci ve světě<sup>9</sup> mapuje tabulka č. 1.

**Tabulka č. 1: Prevalence TBC v jednotlivých částech světa (vztaženo na 100 tis. obyvatel/rok).**

Oblast	Prevalence
Jihovýchodní Asie	240
Afrika	214
Východní Evropa	47
Průmyslové státy	22
Celosvětově	146

### **Současná epidemiologická situace v České republice<sup>10</sup>**

V České republice bylo v roce 2007 hlášeno 871 případů tuberkulózy (TBC), v relaci k počtu obyvatel to představovalo 8,4 případu na 100 tis. obyvatel. V tomto údaji jsou zahrnuta onemocnění bakteriologicky ověřená i neověřená a TBC všech forem a lokalizací. Proti roku 2006 tak došlo ve sledovaném roce k poklesu hlášených onemocnění o 102 případů (10,5 %), v přepočtu na 100 tis. obyvatel činil meziroční pokles 11,6 % oznámených případů. U mužů bylo zjištěno 598 případů TBC (tj. o 9 případů méně než v roce 2006) a u žen 273 případů (tedy o 25,4 % méně než v roce 2006). U mužů se tuberkulóza vyskytuje mnohem častěji (11,9 mužů ze 100 tis.) než u žen (5,2 žen ze 100 tis.), u obou pohlaví byla převažující diagnózou tuberkulóza dýchacího ústrojí.

Bakteriologicky ověřeno bylo 562 případů, tj. 64,5 %, z toho 382 případů u mužů (63,9 %) a 180 u žen (65,9 %). V roce 2007 byl podíl bakteriologicky ověřených onemocnění nepatrně vyšší než v předchozím roce.

Nově zjištěných onemocnění bylo celkem hlášeno 848 (583 případů u mužů, 265 u žen), recidiv 23 (muži 15 případů, ženy 8 případů).

## 1.2. Mykobakterie

Mykobakterie jsou grampozitivní nepohyblivé pleiomorfni tyčinky z řádu *Actinomycetales*. Rod *Mycobacterium* je jediným rodem čeledi *Mycobacteriaceae*. Vysoké procentuální zastoupení G a C bazí v DNA rodu *Mycobacterium* (62 až 70 %) je podobné jako u ostatních bakterií produkujících kyselinu mykolovou, u rodů *Nocardia* (60 až 69 %), *Rhodococcus* (59 až 69 %) a *Corynebacterium* (51 až 59 %). *Mycobacterium tuberculosis* (obrázek č.1) spolu s *M. bovis*, *M. africanum*, a *M. microti* vyvolávají onemocnění člověka známé jako tuberkulóza a jsou řazeny do komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Do komplexu *Mycobacterium avium* (někdy též označován *Mycobacterium avium-intracellulare*<sup>12</sup>) pak vedle *Mycobacterium avium* poddruh *avium*, *paratuberculosis* a *silvaticum* patří ještě *M. intracellulare*. Mikroorganismy tohoto komplexu jeví nízkou patogenitu, jsou široce rozšířeny ve vnějším prostředí a jejich izolace z asymptomatických jedinců je velmi častá. Samostatně stojí druh *M. leprae* – původce lepry u člověka. Tento druh, na rozdíl od ostatních mykobakterií se nepodařilo kultivovat *in vitro*. Naproti tomu druhy komplexu *M. fortuitum* (*M. abscessus*, *M. fortuinum*, *M. mucogenicum* a *M. genavense*) se vyznačují rychlým růstem na kultivačních půdách. Řada dalších druhů mykobakterií způsobuje onemocnění u lidí jen ojediněle, popřípadě jsou zcela nepatogenní<sup>11</sup>.

Důležitým znakem, jenž je způsoben lipidovým charakterem buněčné stěny, je acidorezistence tj. odolnost k odbarvení zředěnou anorganickou kyselinou po obarvení horkým karbolfuchsinem nebo jinými arylmethanovými barvivy<sup>12</sup>. Další charakteristickou vlastností je dlouhá generační doba při pomnožování na umělých půdách i v makroorganismu. To je způsobeno složitým metabolismem, zejména biosyntézou specifických lipidů, které jsou odpovědné za specifické tkáňové reakce v makroorganismu<sup>13</sup>.

Buněčná stěna mykobakterií má unikátní stavbu a její složky se významným způsobem podílejí na virulenci tohoto typu mikroorganismu. Vyznačuje se extrémní hydrofobicitou, která je způsobena vrstvou mykolové kyseliny, která je buď kovalentně nebo nekovalentně (v podobě dimykolátu trehalosy TDM) vázána k buněčné stěně tvořené arabinogalaktanem. Ten kryje peptidoglykanovou vrstvou buněčné bakteriální membrány. Do této základní struktury jsou pak zakotveny další bioaktivní složky. Jednou z nich je glykolipid lipoarabinomanan (LAM), který je zastoupen ve stěnách různých mykobakteriálních druhů třemi typy. LAM zakončený manózovými zbytky

(tzv. ManLAM) virulentních kmenů *M. tuberculosis* přímo inhibuje odpověď makrofágů na mykobakteriální infekci. Další složkou stěny virulentních mykobakterií s modulačními účinky na lymfocytovou proliferaci je ftiocerodimykokerozát (PDIM), který je považován přímo za faktor virulence. Rovněž samotný TDM inhibuje fúzi fagozomů s lysozomy a je toxický pro mitochondrie<sup>11</sup>.

Genom kmene *M. tuberculosis H37Rv* obsahuje asi 4000 genů, z čehož na 200 se účastní metabolismu mastných kyselin; to je zhruba dvojnásobný počet, než u jiných mikroorganismů<sup>14</sup>.

Syntézy mastných kyselin u mykobakterií se účastní dva enzymy:

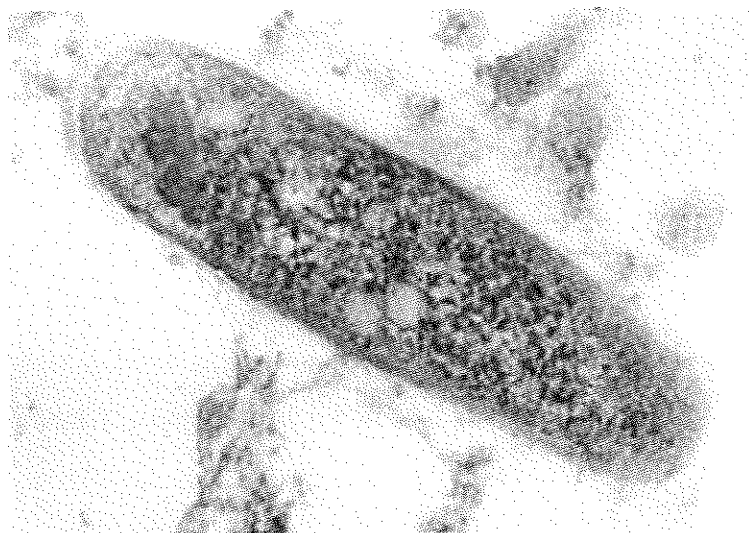
FAS-I tj. *fatty acid syntetasa I*, což je velký samostatný protein podobný enzymu, který je znám v živočišných buňkách a FAS-II – enzymatický komplex tvořený nekovalentně vázanými podjednotkami. Dvouhlíkaté molekuly acetylkoenzymu A jsou konvertovány na 16-24 uhlíkaté mastné kyseliny právě tímto multifunkčním enzymem. Tyto mastné kyseliny mohou být využity k tvorbě triglyceridů a fosfolipidů. Mohou být též prodlouženy enzymatickým komplexem zvaným jako FAS-II na meromykoláty, mastné kyseliny obsahující přes 50 uhlíkových atomů. Meromykoláty jsou dále modifikovány a spojeny do konečné podoby mykolových kyselin, které jsou včleněny do mykobakteriálního obalu<sup>15</sup>.

**Tabulka č. 2: Jiné zajímavé složky buněčné stěny mykobakterií.**

Označení složky buněčné stěny případně kódujícího genu	Funkce
<b>Erp</b>	Tento protein se vyskytuje na buněčném povrchu. Nevyskytuje se u nepatogenních bakterií. Funkce není plně známa. Pravděpodobně má vliv na kolonizaci plicní tkáně <sup>16</sup> .
<b>Mas</b>	Enzym, katalyzující syntézu mnohočetně metylovaných dlouhých řetězců mastných kyselin. Výskyt pouze u patogenních bakterií <sup>16</sup> .
<b>Fad26</b>	<i>Acetylkoenzym A syntasa</i> . Účastní se degradace mastných kyselin. Mutace vede ke zpomalení růstu <i>in vivo</i> u <i>M. tuberculosis</i> a <i>M. bovis BCG</i> <sup>17</sup> .

Označení složky buněčné stěny případně kódujícího genu	Funkce
MmpL7	Protein důležitý pro virulenci <i>M. tuberculosis</i> a má zřejmě některé transportní funkce. Mutace vede u myši ke zpomalení proliferace <sup>18</sup> .
FbpA	Enzymy přeměňující dlouhé řetězce mykolových kyselin na deriváty trehalosy; mají rovněž schopnost vazby fibrinopektinu <sup>19</sup> .
MmaA4	Methyltransferasa; účastní se tvorby methoxymykolátů a ketomykolátů. Mutace genu vedla k zastavení jejich tvorby a změnám v mykobakteriální buněčné stěně <sup>20</sup> .
OmpA	Protein typu porinu tvoří póry v lipozómech a je indukován v kyselém prostředí a také během růstu mykobakterií v makrofágách. Mutace má za následek zpomalení růstu v kyselém prostředí vyplývající asi z neschopnosti přijímat malé molekuly <sup>21</sup> .

Obrázek č. 1: *Mycobacterium tuberculosis*<sup>22</sup>





Pro zachování virulence celé řady bakteriálních patogenů je nutné zachování schopnosti příjmu některých kovových prvků, zejména hořčíku a železa. Interferencí s metabolismem kovů se vysvětluje účinek např. paraaminosalicylové kyseliny<sup>23</sup>. U *M. tuberculosis* jsou známy geny zodpovědné za příjem kovů do buňky:

**Tabulka č. 3: Geny zodpovědné za příjem kovů do mykobakteriální buňky.**

Gen/protein	Funkce
<b>MgtC</b>	Gen zodpovědný za transportní funkce $Mg^{2+}$ . Mutanti <i>M. tuberculosis</i> se množí špatně v prostředí s nízkým obsahem hořčíku <sup>24</sup> .
<b>MbtB</b>	Kóduje enzym, který se účastní syntézy mykobaktinu, jednoho z hlavních mykobakteriálních sideroforů, které zajišťují solubilizaci a transport železa dovnitř buněk <sup>25</sup> .
<b>IdeR</b>	Protein, který se váže na DNA. Jeho vazba je podmíněna železem. Je významným mykobakteriálním regulátorem genů řídících příjem a ukládání železa. Jeho mutací nelze získat životaschopné mutanty <sup>26</sup> .

**Ostatní významné složky:**

pncA – gen kódující enzym pyrazinamidasu/nikotinamidasu, který je zodpovědný za vznik aktivního metabolitu pyrazinkarboxylové kyseliny z pyrazinamidu. Mutaci tohoto genu vykazuje většina pyrazinamid-rezistentních kmenů<sup>27</sup>.

Difosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolsyntasa – klíčový enzym v methyletrytritolfosfátové cestě. *M. tuberculosis* využívá methyletrytritolfosfátovou cestu pro biosyntézu isopentenylidifosfátu a jeho izomeru - dimethylallyldifosfátu, prekurzorů pro izoprenoidní sloučeniny. Absence této metabolické cesty u člověka a její nezbytnost pro životaschopnost mykobakteriálních buněk dává možnost pro vývoj sloučenin inhibujících tento enzym, což by nových potencionálních léčiv<sup>28</sup>.



Mykobakterie způsobují u člověka tyto nemoci:

Tuberkulózu, která je způsobena čtyřmi úzce příbuznými druhy: *Mycobacterium tuberculosis* (v naprosté většině případů, obrázek č. 1), někdy *Mycobacterium bovis* (původce TBC hovězího dobytka), *Mycobacterium africanum* (původce TBC obyvatel rovníkové Afriky) a vzácně se izoluje *Mycobacterium microti* (původce TBC hrabošů) a *Mycobacterium canettii*<sup>11</sup>; Lepru, kterou způsobuje *Mycobacterium leprae* a oportunní infekce tzv. mykobakteriózy, které způsobují saprofytické druhy (v minulosti označované jako tzv. atypické mykobakterie) při oslabené imunitě<sup>12</sup>.

### 1.3. Tuberkulóza

Tuberkulóza (tuberculosis, TBC) je celosvětově rozšířené onemocnění postihující všechny věkové kategorie a zasahující všechny orgány, především plíce. Řadíme je mezi specifická zánětlivá onemocnění<sup>29</sup>.

#### Epidemiologie

Tuberkulóza<sup>12, 29</sup> se nejčastěji šíří přímým přenosem kapénkovou infekcí, kdy je zdrojem nemocný s rozpadovou tuberkulózou plic a místem vstupu infekce dýchací ústrojí. Infekční je jen sputum bakteriologicky pozitivních pacientů: v 1ml sputa je nejméně 5000 mykobakterií. Vzácněji dochází k infekci nepřímým způsobem např. kontaminovanou potravou, kdy mykobakterie vstupují nejčastěji do mandlí nebo sliznice tenkého střeva. Vyskytuje se hlavně ve špatných sociálních a hygienických podmínkách; nejvíce jsou ohroženi lidé s defekty imunity (AIDS). Výskyt tuberkulózy je vysoký všude tam, kde je současně vysoký výskyt HIV a *Mycobacterium tuberculosis*.

#### Patogeneze onemocnění

Onemocnění tuberkulózou se dnes dělí na dvě základní skupiny:

##### Primární tuberkulóza

Infekce začíná obvykle v plicích inhalací mykobakterií a jejich pohlcením alveolárními makrofágy. V makrofágách se pomnožují a vytvářejí primární lézi, Ghonovo ložisko. Makrofágy zanesou mykobakterie do hilových uzlin a vytvoří se primární komplex. Kromě toho se mykobakterie rozsévají krevní a lymfatickou cestou do orgánů a tkání, včetně ostatních oblastí plic. Při infekci bovinní mykobakterií v mléce deglutiční cestou vznikne primární komplex na tonzilách a v krčních uzlinách – srofula – nebo ve střevech, obvykle v ileocekální oblasti a v mezenterických uzlinách. Do 10 dnů po infekci se produkují klony T-lymfocytů specifických pro antigen. Uvolňují lymfokiny, které aktivují makrofágy a způsobují, že se shromažďují do kompaktních shluků či granulomu kolem ložiska infekce. Střed granulomu obsahuje směs nekrotické tkáně a mrtvých makrofágů. Podle sýrovitého vzhledu a konzistence se tento jev označuje jako kaseifikace. Aktivované makrofágy zabraňují replikaci mykobakterií. Vytvoření granulomu obvykle postačuje k omezení primární infekce: léze se zklidní a přilehlé fibroblasty vytvářejí pevnou jizvu, jež později kalcifikuje. Nejsou

však zničeny všechny mykobakterie; některé zůstávají v klidovém stavu jako perzistory a po reaktivaci způsobí postprimární onemocnění. Někdy může v ložisku nastat progres, což se projeví jako primární onemocnění včetně primárních lézí (zvláště u kojenců) jako meningitidy, pleuritidy, postižení ledvin a páteře a ostatních kostí a kloubů. Praskne-li ložisko do krevního oběhu, jsou mykobakterie rozneseny do celého těla a vytvářejí se četné granulomy. Tato forma se označuje jako miliární tuberkulóza.

### Postprimární tuberkulóza

Primární komplex často mizí a jedinou stopou po infekci je konverze tuberkulinové reaktivity. Postprimární tuberkulóza se vyvíjí po měsících, letech nebo desetiletích, kdy se klidné ložisko může reaktivovat nebo dojde k exogenní reinfekci. Reaktivace nastane buď spontánně, nebo při jiném onemocnění, nebo za jiných okolností, jež vedou k poklesu imunity. K reaktivaci dochází téměř vždy v horních plicních lalocích. Opět se vytváří granulom, nekróza je však intenzivní a oblast kaseifikace rozsáhlá – vzniká tuberkulom. Proteolytické enzymy uvolněné aktivovanými makrofágy změkčují a zkapalňují kazeózní zbytky a velké množství tumor nekrotizujícího faktoru vyvolává typické znaky TBC – horečky a kachektizaci. Uvnitř tuberkulomu je silně kyselá reakce, anoxie a zcela malé množství živých mykobakterií. Léze se zvětšuje a nakonec nahlodá bronchus, zkapalněný obsah se vyprázdní a zbude dutina komunikující s dýchacími cestami. Složení vzduchu v plicích s vysokým obsahem oxidu uhlíku je příhodné pro množení mykobakterií, jež osidlují stěnu dutiny. Z dutiny pronikají mykobakterie ve velkém množství do sputa a pacient se stává zdrojem nákazy. Diseminace mykobakterií do lymfatických uzlin a orgánů je vzácná. Infekce se šíří bronchiálním stromem a sekundární ložiska vznikají v dolních plicních lalocích, ale i v laryngu. Postižena může být i trachea a dutina ústní, odkud spolykané mykobakterie způsobí léze ve střevě.

### **Tuberkulóza osob s oslabenou imunitou**

Při oslabení imunity je reaktivace tuberkulózy velmi pravděpodobná, zejména u starých osob, pacientů po transplantaci a také u osob HIV-pozitivních, kde je tuberkulóza diagnostikována dříve, než se objeví znaky syndromu získaného imunodeficitu (AIDS). Dutiny nevznikají, což potvrzuje význam imunitní reakce hostitele v patogenezi tuberkulózy. Místo dutiny vzniká v plicích bez místní predilekce difúzní infiltrát a hematogenní a lymfogenní cestou vznikají infiltráty i jinde. Někdy se

po celém těle vyvíjejí četné drobné léze, hustě naplněné mykobakteriemi. Je to rychle progredující smrtelná forma tuberkulózy – kryptická diseminovaná tuberkulóza.

## 1.4. Mykobakteriózy

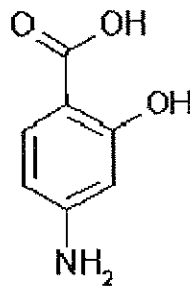
Klinické<sup>12, 30</sup> i morfologické projevy mykobakterióz jsou zcela obdobné jako u klasické TBC, od které se nedají odlišit bez druhové identifikace původce. V plicní lokalizaci se nejčastěji uplatňují *M. kansasii*, komplex *M. avium - intracellulare* a *M. xenopi*. Rychle rostoucí *M. fortuitum* a *M. chelonae* vyvolávají procesy, které připomínají pneumonie nebo bronchopneumonie, často na podkladě lipidních pneumopatií při achalazii kardie nebo megaesofagu. U dětí se relativně často vyskytují periferní lymfadenitidy v orofaciální oblasti vyvolané komplexem *M. avium*, *M. scrofulaceum* a rychle rostoucími druhy. Původcem mnohočetných hlubokých vředů na končetinách v endemických oblastech tropické Austrálie, Afriky, Asie a Ameriky je *M. ulcerans* (syn. *M. buruli*). Kožní afekce označované *mycobacteriosis balnearea* jsou vyvolávány *M. marinum* (syn. *M. balnei*) a vyskytují se i u nás pod obrazem uzlíkovitých ulcerací na predilekčních místech drobných poranění na horních i dolních končetinách jako následek vniknutí a pomnožení původce z kontaminovaných bazénů. V koexistenci s imunodeficitními stavy, především s infekcí HIV, jsou mykobakteriózy mimořádně závažnou komplikací. Nejčastější původce představuje komplex *M. avium - intracellulare*, ale uplatňují se i další druhy. Infekce probíhají často pod obrazem bizarních mimoplicních, diseminovaných nebo generalizovaných maligních projevů. Až polovina pacientů, kteří zemřeli na AIDS, měla diseminované onemocnění projevující se horečkou, úbytkem na váze, nočním pocením, bolestmi v břiše, průjmy a anémií. Z tohoto důvodu je u těchto osob nutná chemoprophylaxe.

## 1.5. Antimykobakteriální léčiva

### 1.5.1. Chemické struktury a mechanismy účinku antimykobakteriálních léčiv:

#### 1. Skupina kyseliny p-aminosalicylové

p-aminosalicylová kyselina, synonymum PAS



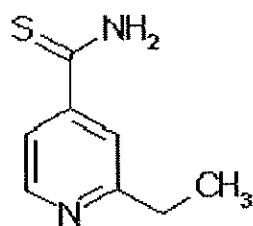
p-aminosalicylová kyselina

PAS je chemicky 4-amino-2-hydroxybenzoová kyselina.

Mechanismus účinku: Dříve byl vysvětlován kompeticí PAS a PABA o aktivní centrum enzymu (dihydropteroatsyntetasy), který se účastní konverze PABA na dihydropteroovou kyselinu. Pravděpodobněji mechanismus účinku spočívá v chelataci kationtů železa, tj. v zabránění jejich přenosu prostřednictvím ionoforu mykobaktinu<sup>23</sup>.

## 2. Sloučeniny se skupinou –CSNH–

Nejvýznamnější antituberkulotika se skupinou –CSNH– jsou v současnosti thioamidy. ethionamid



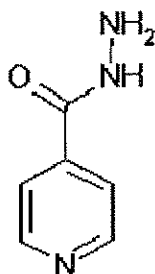
ethionamid

Je to 2-ethylisonikotinthioamid.

Mechanismus účinku: V organismu dochází k desulfuraci a vzniká látka podobná isonikotinové kyselině (viz níže Mechanismus účinku isoniazidu)<sup>23</sup>.

## 3. Hydrazidy

isoniazid



isoniazid

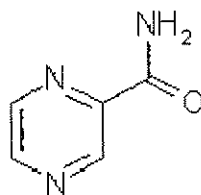
Je to hydrazid kyseliny isonikotinové.

Mechanismus účinku: Není plně objasněn. V mykobakteriální buňce interferuje s metabolismem amidu kyseliny nikotinové, který je součástí NAD. Je aktivován katalasou-peroxidasou *Kat G* na nestabilní meziprodukt, který reaguje s NAD<sup>41</sup>. To může vysvětlovat inhibici různých pochodů látkové přeměny např. syntézy kyseliny mykolové<sup>23</sup>.



#### 4. Amidy

##### pyrazinamid



pyrazinamid

Je to amid kyseliny pyrazinkarboxylové.

Mechanismus účinku: Není plně objasněn. Pyrazinamid (PZA) je pro léčivo, které musí být aktivováno bakteriální pyrazinamidásou (PZasa). Výsledkem je aktivní metabolit pyrazinkarboxylová kyselina<sup>31</sup>. Pro tuto skutečnost svědčí i fakt, že *M. bovis BCG*, je rezistentní vůči PZA, protože postrádá pyrazinamidásovou aktivitu<sup>15</sup>. Zimhony, et al. užil kombinace biochemických a genetických metod a označil FAS-I jako primární cíl pyrazinamidu u *M. tuberculosis*<sup>32</sup>. Naproti tomu Boshoff provedl sérii pokusů, které demonstrují, že pyrazinkarboxylová kyselina (POA) neinhibuje izolovanou FAS-I, a tudíž tento enzym není přímým cílem PZA. Dále srovnával účinky kyseliny pyrazinkarboxylové, nikotinové a benzoové, stejně tak jako odpovídajících amidů na celé buňky *M. tuberculosis* a *M. smegmatis* a inhibiční efekt označil nikoli jako důsledek modulace syntézy mastných kyselin, ale jako odpověď na kyselý stres<sup>33</sup>. Zhang, et al. vysvětluje mechanismus účinku PZA následovně: PZA je deaminován v buňce PZasou a vzniklá kyselina je aktivně transportována z buňky. POA je v kyselém prostředí reabsorbována (v kyselém prostředí se nachází v nedisociované a prosté difúze schopné formě) zpět do bakterie a kumuluje se v poškozené buňce, která tím zároveň ztrácí schopnost transportovat POA z buňky. To by vysvětlovalo, proč je PZA aktivní více proti starším, pomalu rostoucím, než proti mladým, aktivně se množícím, mykobakteriím; pravděpodobně proto, že mladé, aktivně se množící bakterie, mají celkově rychlejší metabolismus a tudíž k dispozici více energie potřebné k aktivnímu transportu PZA<sup>34</sup>.

V roce 2007 Zimhony, díky sérii pokusů, opět označil POA a některé deriváty jako inhibitory FAS I. Zjistil, že POA, propylester pyrazinkarboxylové kyseliny a 5-chlorpyrazin-2-karboxamid inhibují FAS I a mají antituberkulotickou aktivitu i proti PZA rezistentním mykobakteriím, což potvrzuje nutnost aktivace mykobakteriální



amidasou. V případě esterů není aktivace uskutečněna PZasou, ale esterasami, které jsou přítomné i PZasa-deficitních rezistentních kmenech<sup>35</sup>.

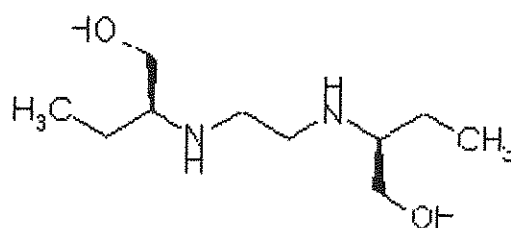
K podhalení mechanismu účinku by mohl přispět i fakt, že pyrazinamid není aktivní *in vitro* za běžných kultivačních podmínek a při neutrálním pH. Při pH 5,5 - 6,0 je MIC = 50 - 100 mg/l. Některé slabé kyseliny (benzoová, sorbová, propylhydroxybenzoová nikoli však salicylová a mléčná), UV záření a různé energetické inhibitory (karbonylkyanid, m-chlorfenylhydrazon a dinitrofenol) zvyšují aktivitu pyrazinamidu *in vitro* proti *M. tuberculosis*<sup>36</sup>; stejně jako anaerobní inkubace<sup>37</sup> či železo (nikoliv však vápník, hořčík či zinek)<sup>38</sup>.

*In vivo* podávání ibuprofenu a acetylsalicylové kyseliny spolu s PZA myším mělo větší efekt proti *M. tuberculosis* než podávání PZA samotného<sup>39</sup>.

Byla objevena nová skupina antituberkulotik tzv. diarylchinoliny, které inhibují ATP-syntasu *M. tuberculosis*. Jsou aktivní proti senzitivním i rezistentním kmenům *M. tuberculosis*. Látka z této skupiny, označovaná jako R207910 (viz dále str. 28), vykazuje významný synergismus s ostatními antituberkulotiky (isoniazidem, rifampicinem, moxifloxacinem, pyrazinamidem). Kombinace s pyrazinamidem byla nejúčinnější<sup>40</sup>.

### Deriváty ethylendiaminu

ethambutol



ethambutol

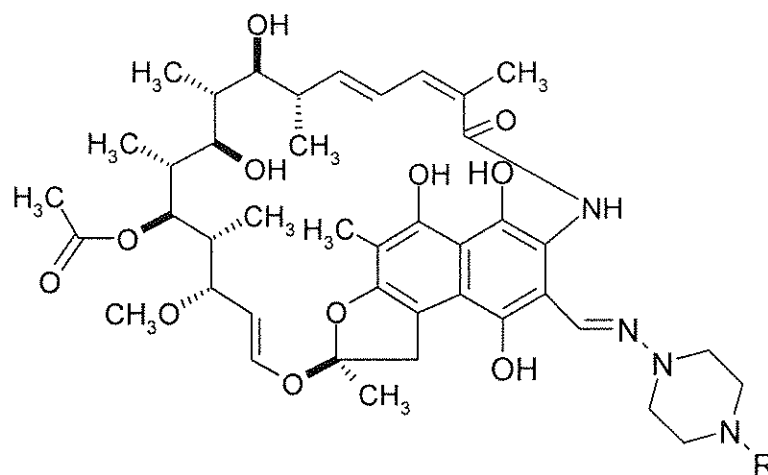
Chemicky je to (*R*)-2,2'-(1,2-ethandiyl-diimino)bis-1-butanol.

Mechanismus účinku: Polymerizace arabinosy v buněčné stěně, místem jeho účinku je arabinofuranosyltransferasa. Na účinku se projevuje též chelatační schopnost této látky<sup>23</sup>.

## 5. Ansamyciny

Jedná se o makrocyclické laktamy. Jde o ansasloučeniny, které mají plochou aromatickou část molekuly přemostěnou dlouhým alifatickým řetězcem s laktamovou vazbou.

V terapii TBC jsou významné: rifampicin (syn. rifampin), rifabutin, rifapentin<sup>23</sup>.

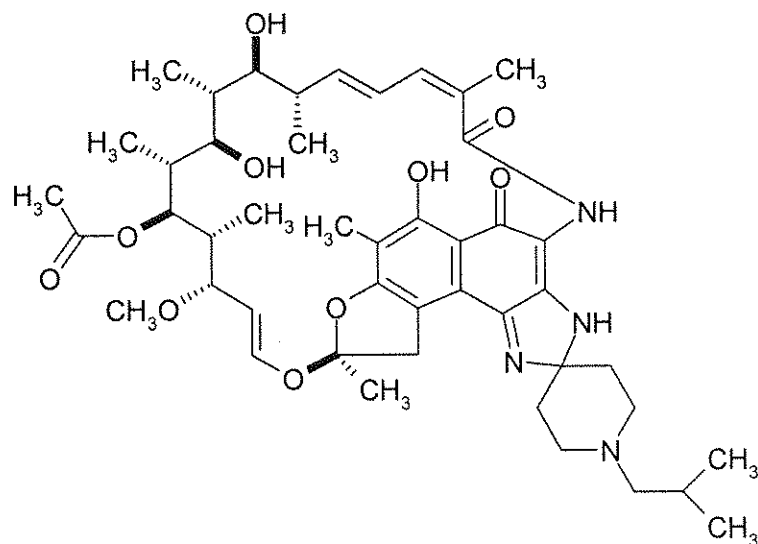


R = -CH<sub>3</sub>      rifampicin

R =       rifapentin

Rifampicin je chemicky (2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-8-[N-(4-methyl-1-piperazinyl)formimidoyl]-5,6,9,17,19,21-hexahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-2,7-(epoxypentadeka[1,11,13]trienimino)nafto[2,1-*b*]-furan-1,11(2*H*)-dion-21-acetát .

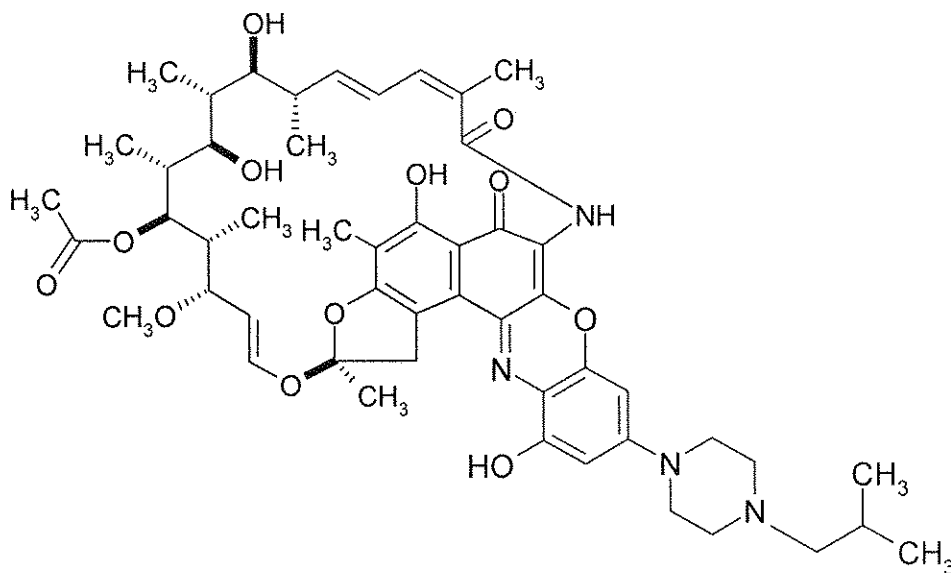
Rifapentin pak (2*S*,12*Z*,14*E*,16*S*,17*S*,18*R*,19*R*,20*R*,21*S*,22*R*,23*S*,24*E*)-8-[N-(4-pentyl-1-piperazinyl)formimidoyl]-5,6,9,17,19,21-hexahydroxy-23-methoxy-2,4,12,16,18,20,22-heptamethyl-2,7-(epoxypentadeka[1,11,13]trienimino)nafto[2,1-*b*]-furan-1,11(2*H*)-dion-21-acetát .



rifabutin

Rifabutin je (9*S*,12*E*,14*S*,15*R*,16*S*,17*R*,18*R*,19*R*,20*S*,21*S*,22*E*,24*Z*)-6,16,18,20-tetrahydroxy-1'-isobutyl-14-methoxy-7,9,15,17,19,21,25-heptamethylspiro[9,4-(epoxypentadeka[1,11,13]trienimino)-2*H*-furo[2',3':7,8]nafto[1,2-*d*]imidazol-2,4'-piperidin]-5,10,26-(3*H*,9*H*)-trion-16-acetát.

Mezi nejnovější antimykobakteriální látky této řady patří benzoxazinorifamycin.

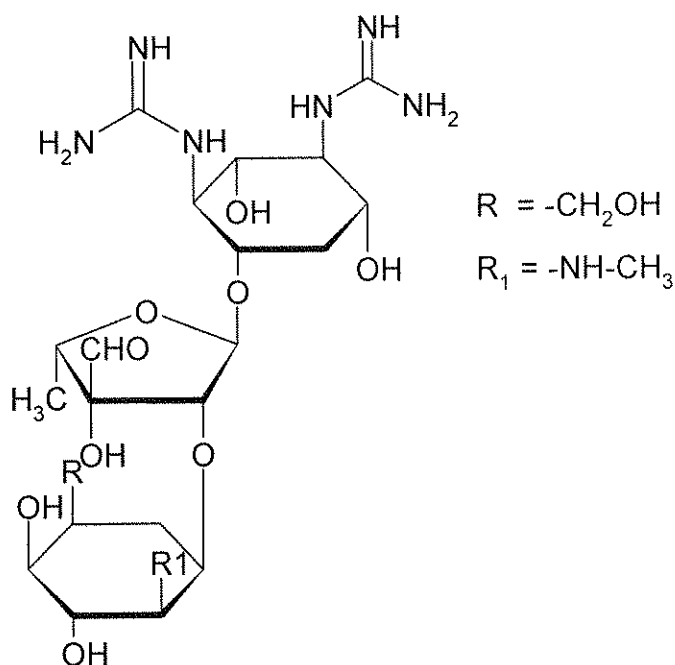


benzoxazinorifamycin

Mechanismus účinku: Ansamyciny inhibují bakteriální růst silnou vazbou na DNA-dependentní RNA-polymerasu a tím inhibují syntézu bakteriální RNA<sup>23</sup>.

## 6. Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou bazické oligosacharidy, jejichž molekula je vázána glykosidicky vázanými aminocukry. Jeden z aminocukrů patří vždy mezi cyklitoly. Tuberkulóza je hlavní indikační skupinou streptomycinu, kanamycinu a jeho derivátu amikacinu.

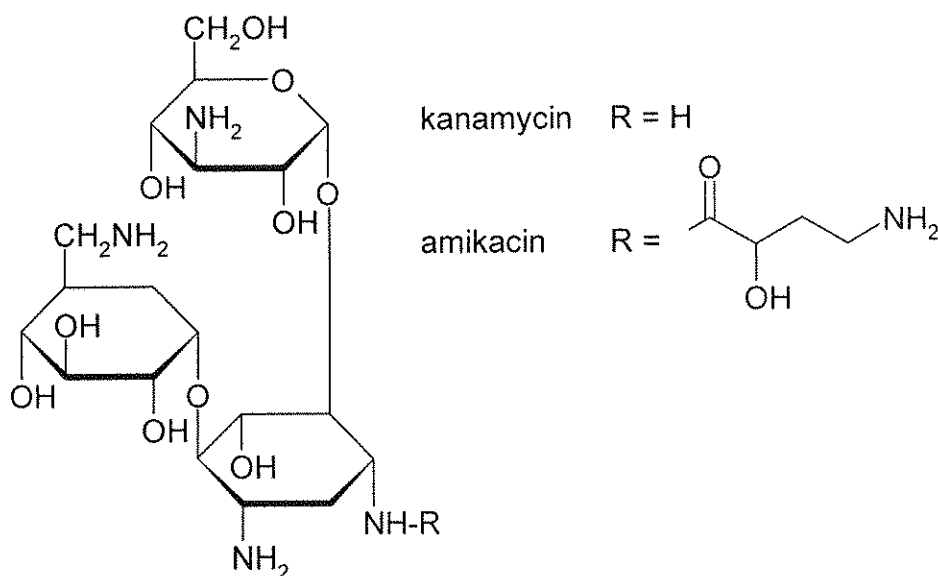


streptomycin

Streptomycin je 2,4-diguanidino-3,5,6-trihydroxycyklohexyl-5-deoxy-2-*O*-(2-deoxy-2-methylamino- $\alpha$ -L-glukopyranosyl)-3-formyl- $\beta$ -L-lyxo-pentafuranosid.

Cyklitolem je zde streptidin, který je vázán glykosidickou vazbou na methylpentosu streptosu a na ni je dále vázán N-methyl-L-glukosamin. Celá molekula je stabilizována intramolekulární cyklizací aldehydické skupiny streptosu<sup>23</sup>.

U kanamycinu je cyklitolem 2-deoxy-L-streptamin. V případě amikacinu je na jeho aminoskupinu v sousedství glykosidické vazby amidicky vázána 4-amino-2-L-hydroxymáselná kyselina. Tento krok má zabránit rozvoji rezistence, neboť právě tato aminoskupina je citlivá na ataky inaktivačních enzymů. Na cyklitol jsou glykosidicky vázány 6-D-glukosamin a kanosamin<sup>23</sup>.



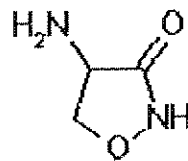
Kanamycin je chemicky 4-(3-desoxy-3-amino- $\alpha$ -D-glukopyranosyloxy)-6-(6-desoxy-6-amino- $\alpha$ -D-glukopyranosyloxy)-2-desoxy-D-streptamin.

Amikacin pak *O*-3-Amino-3-desoxy- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-[6-amino-6-desoxy- $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]-*N*<sup>3</sup>-(4-amino-L-2-hydroxybutyryl)-2-desoxy-L-streptamin.

Mechanismus účinku: Prvním stupněm interakce s bakteriální buňkou je vazba aminoglykosidu na specifický receptorový protein na 30S podjednotce mikrobiálního 70S ribosomu. Druhým stupněm je blokáda normální aktivity „iniciačního komplexu“ tvorby peptidu aminoglykosidem. Ve třetím stupni je informace, nesená mRNA, chybně přečtena v „rozpoznávací oblasti“ ribosomu, a následuje vložení nesprávné aminokyseliny do peptidu a vznik nefunkční bílkoviny. Důsledkem vazby aminoglykosidu je i rozpad polysomů a jejich rozdělení na „monosomy“, které nejsou schopny proteosyntézy<sup>23</sup>.

## 7. Skupina cykloserinu

Cykloserin



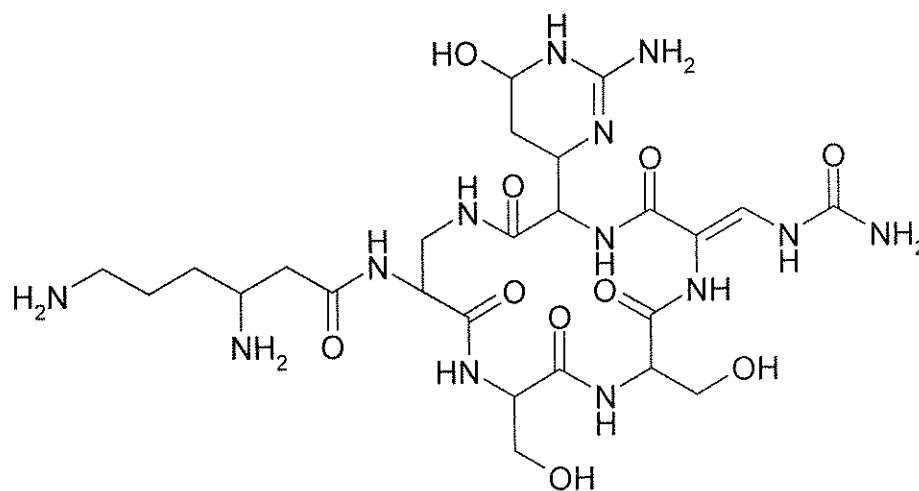
cykloserin

D-cykloserin je chemicky D-4-amino-3-isoxazolidinon.

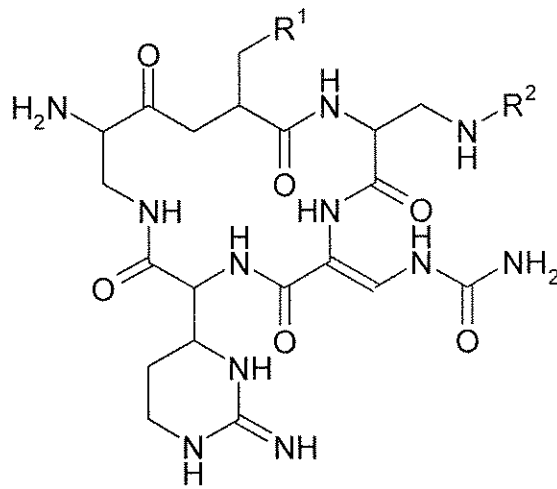
Mechanismus účinku: Cykloserin brání inkorporaci D-alaninu do pentapeptidu peptidoglykanu buněčné stěny tím, že inhibuje enzym alaninracemasu. Narušuje tedy syntézu buněčné stěny<sup>23</sup>.

## 8. Polypeptidy

Pro případy rezistence na jiná antimykobakteriální léčiva jsou rezervovány dva silně bazické polypeptidy kapreomycin a viomycin<sup>23</sup>.



viomycin

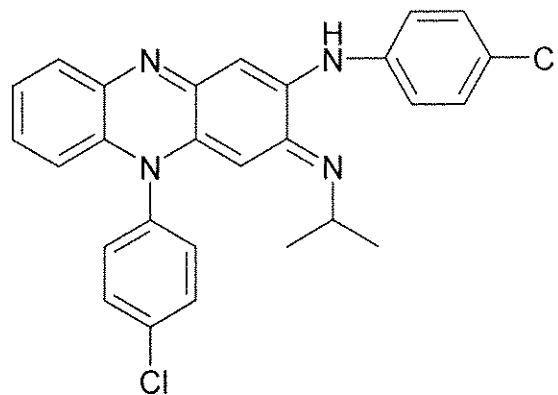


kapreomycin

	$R^1$	$R^2$
IA	-OH	
IB	-H	
IIA	-OH	-H
IIB	-H	-H

## 9. Iminofenaziny

Jedná se o barevné sloučeniny; používají se především proti lepre, ale uplatnění dosáhly též v terapii některých mykobakterióz způsobených *M. intracellulare*. Nejdůležitější je klofazimin<sup>23</sup>.



klofazimin

Chemicky je to 2-(4-chloranilino)-5-(4-chlorfenyl)-3,5-dihydro-3-isopropyliminofenazin.

## 10. Antimykobakteriální léčiva různých chemických struktur

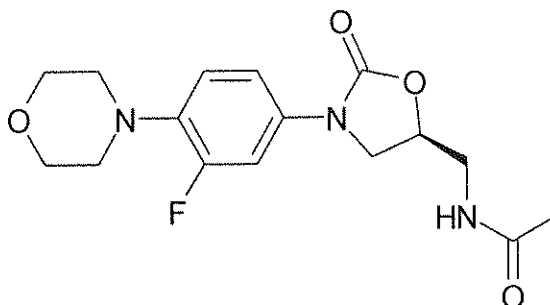
Využití těchto léčiv není omezeno jen na terapii mykobakteriálních infekcí. Klinicky se užívají makrolidy (klarithromycin, azithromycin), fluorované chinolony (např. ofloxacin, enoxacin, lomefloxacin, tosufloxacin, fleroxacin), beta-laktamy (cefoxitin, imipenem), tetracykliny. Tyto látky jsou podrobněji rozvedeny v diplomové práci, na kterou tato rigorózní práce navazuje<sup>2</sup>.

### 1.5.2. Nová léčiva ve fázi klinického hodnocení

#### 1.5.2.1. Sloučeniny nových struktur

##### Oxazolidinony

První antibiotikum této skupiny, které již bylo schváleno pro léčbu MDR – tuberkulózy je linezolid. Mezi nejzávažnější nežádoucí účinky, které se u něj vyskytly, patří periferní neuropatie; je důkladně studována zvláště její reverzibilita<sup>41</sup>.

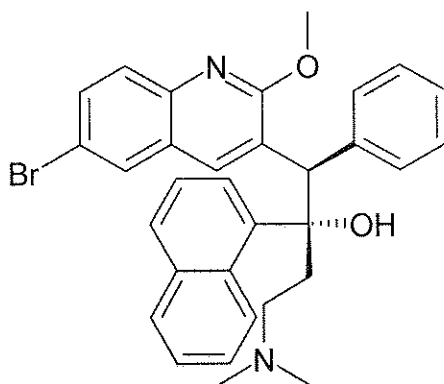


linezolid



## Diarychinoliny

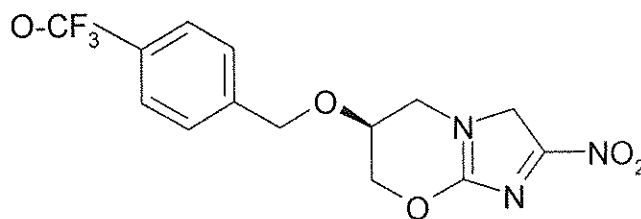
Sloučenina, označovaná jako R 207910/TMC207 (již zmíněná v této kapitole) má velmi dobrou aktivitu *in vitro* proti rostoucím *M. tuberculosis* ( $MIC_{99} = 0,06 \mu\text{g/ml}$ ). Zavedení patentu této látky bude patrně do dvou let. Výsledky I. fáze klinického testování na lidech jsou slibné<sup>40, 41</sup>.



R 207910/TMC207

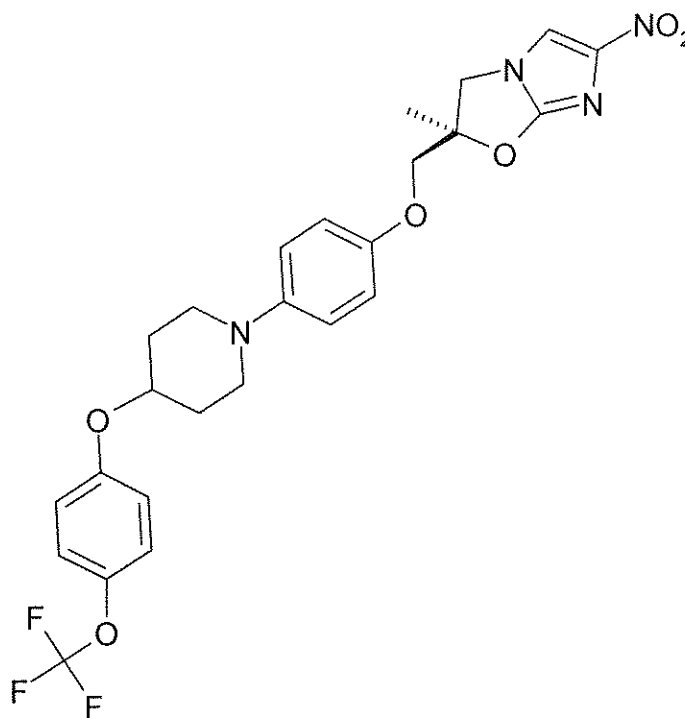
## Bicyklo - nitroimidazoly

První zmínky o těchto sloučeninách jsou z roku 1970, kdy se zvažovalo jejich užití jako radiosenzitizérů. Pozdější práce vedly k rozpoznání jejich efektu na *M. tuberculosis* a k syntéze látky označované jako PA-824. Obecná obava ze sloučenin nesoucích nitroskupinu, coby potencionálních kancerogenů, měla za následek jejich pomalý vývoj. PA-824 nevykazuje mutagenitu v Amesově testu a ani nebyla prokázána biotransformace na potenciální kancerogenní sloučeniny cytochromem P450. V současné době je tato sloučenina klinicky hodnocena.



PA-824

Další výzkum této skupiny látek vedl k sérii nitroimidazo[2,1-b]oxazolů. Látka z této skupiny, OPC-676883, je ve fázi klinického hodnocení od roku 2004<sup>41</sup>.

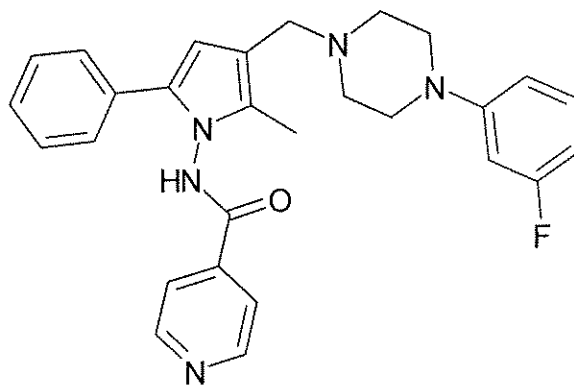


OPC-676883

#### 1.5.2.2. Látky odvozené od struktur běžně užívaných antituberkulotik

##### Analoga isoniazidu

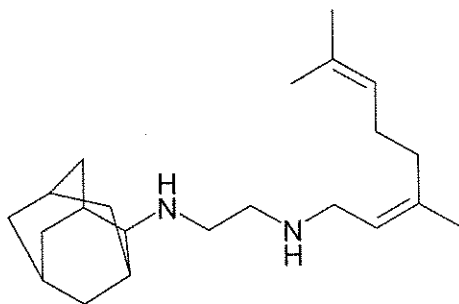
Níže uvedený derivát pyrrolu se ukázal být aktivní *in vivo* na murinním modelu, jenž byl infikován rezistentními kmeny *M. tuberculosis*<sup>41</sup>.



##### Analoga ethambutolu

Ethylendiaminový derivát s adamantanovým uskupením SQ109 vykazuje vysokou antimykobakteriální aktivitu včetně MDR kmenů. Jeho příznivé

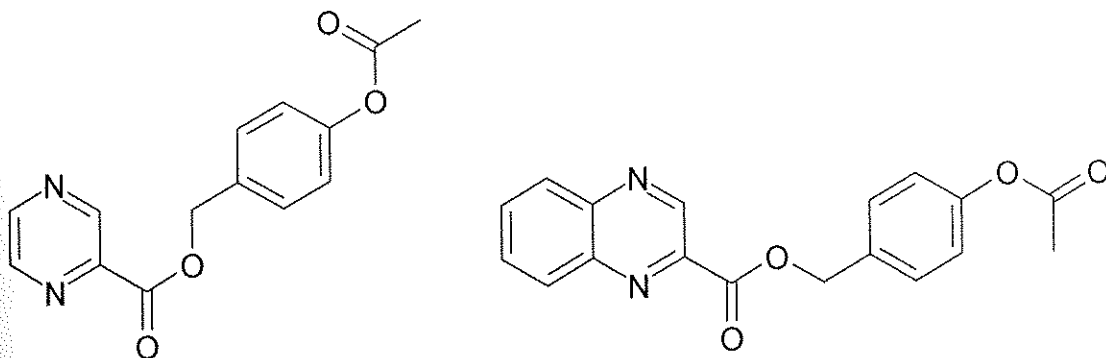
farmakologické vlastnosti a synergický efekt s jinými antituberkulotiky dovedly sloučeninu ke klinickému hodnocení (od roku 2006) <sup>41</sup>.



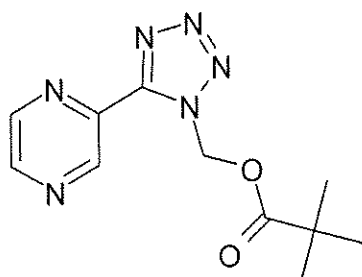
SQ109

### Analoga pyrazinamidu

Seitz a kol. syntetizoval deriváty pyrazinu a chinoxalinu. Vesměs se jednalo o estery pyrazinkarboxylové kyseliny, isosterní nikotinové, benzoové kyseliny a estery kyseliny chinoxalin-2-karboxylové, její amid případně hydrazid. Byla zjišťována jejich aktivita proti *M. tuberculosis* a *M. avium*. Nejúčinnější z nich byly 4-acetoxybenzylester pyrazinkarboxylové kyseliny a 4'-acetoxybenzylchinoxalin-2-karboxylát. Oba vykazovaly vynikající aktivitu proti *M. tuberculosis* (MIC byla menší než rozmezí 1 – 6,25 µg/ml), ale jen slabou proti *M. avium - intracellulare* (MIC se nacházela mezi 4 – 32 µg/ml) <sup>42</sup>.



Jiné účinné deriváty pyrazinamidu prezentoval Wächter a kol., když nahradil karboxylovou skupinu za isosterní tetrazolový kruh a dal tak vzniknout účinnému proléčivu <sup>41</sup>.



## 1.6. Terapie mykobakteriálních infekcí

TBC<sup>43</sup> všech lokalizací se dnes léčí výhradně podáváním kombinací antituberkulotik (AT). Podle Mitchisonovi teorie existují v tuberkulózních ložiscích mykobakterie s různými růstovými vlastnostmi:

1. Největší část mykobakteriální populace se rychle dělí, je uložena extracelulárně a roste nejlépe v podmínkách odpovídajících kaverně, tedy v zásaditém prostředí a za dobrého přístupu kyslíku.
2. Menší část je lokalizována v uzavřených kaseózních ložiscích se spíše neutrálním pH, kdy se střídají období dělení a růstového klidu.
3. Další menší počet bakterií je uložen v oblastech, kde kyselé prostředí a nedostatek kyslíku výrazně omezily jejich schopnost dělení.
4. Nejmenší částí mykobakteriální populace jsou tzv. „spící bacily“, které se nedělí, nerostou, a na které také nepůsobí žádné léky.

Důležitost druhé a třetí skupiny tzv. perzistorů, je v tom, že po neutralizaci tkáňového prostředí mohou opět získat růstovou aktivitu a stát se původci vzplanutí nového onemocnění.

V souvislosti s výše uvedenými charakteristikami mykobakteriální populace je důležité rozlišení a uplatnění dvou základních vlastností AT:

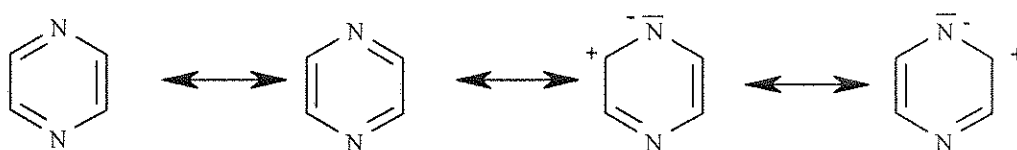
- a) Baktericidní účinek – usmrcování největší části rychle se dělící mykobakteriální populace (isoniazid, rifampicin aj. ansamyciny, streptomycin, ethambutol (bakteriostatický)).
- b) Sterilizační účinek, to je zabíjení tzv. perzistorů, tedy menších skupin bakterií s omezeným růstem (pyrazinamid, rifampicin aj. ansamyciny, částečně isoniazid).

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Vybrané chemické vlastnosti pyrazinu

Pyrazin představuje vysoce symetrickou molekulu. Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid struktur (obrázek č. 2). Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu (tabulka č. 4), která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciálních alifatických aminů. Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base (tabulka č. 5), která však v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je bazí nejslabší<sup>44</sup>.

Obrázek č. 2.



Tabulka č. 4: Srovnání aromaticity některých dusíkatých heterocyklů s benzenem<sup>45</sup>.

Sloučenina	% aromaticity
Benzen	100
Pyridin	82
Pyridazin	65
Pyrimidin	67
Pyrazin	75

Tabulka č. 5: Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů.

Sloučenina	pKa (1.stupeň)
Pyridin	5,20
Pyridazin	2,33
Pyrimidin	1,30
Pyrazin	0,65

Z hodnot  $\pi$ -elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota  $\pi$ -elektronů je zvýšená na dusíkových atomech, zatímco na uhlíkových atomech je hustota výrazně menší. Vypočítané hodnoty se od naměřených téměř neliší. Je patrné, že hustoty  $\pi$ -elektronů na  $\alpha$ -uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi podobné a lze očekávat i podobnou chemickou reaktivitu  $\alpha$ -substituovaných pyrazinů a pyridinu<sup>46,47,48,49</sup>, viz obrázek č. 3.

Obrázek č. 3.



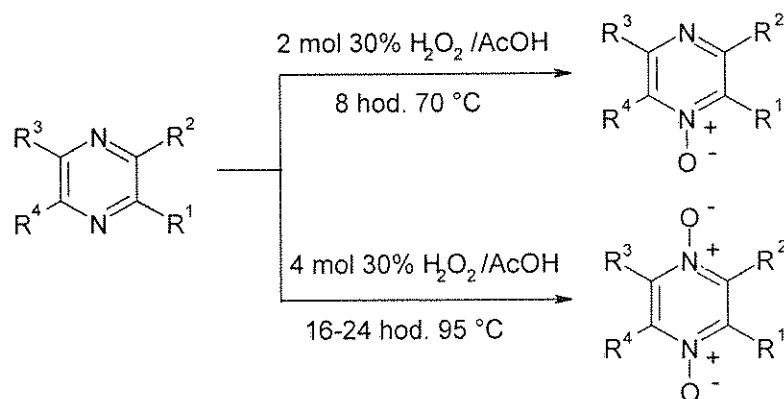
Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivní geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární, vzdálenost C-H je 13,48 nm, C-C potom 13,83 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového jádra, takže úhel sevřený N<sup>1</sup>,  $\alpha$ - a  $\beta$ -uhlíkem je o 5° ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu<sup>50</sup>.

Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel-Craftsovým aromatickým substitucím. 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, obzvláště v případě, kdy je pyrazinový kruh aktivován převedením na *N*-oxid.

## 2.2. Příprava *N*-oxidů pyrazinu

*N*-oxidy pyrazinu se připravují nejčastěji pomocí peroxidu vodíku v prostředí octové kyseliny. *N*-oxidace pyrazinu probíhá v závislosti na délce zahřívání, reakční teplotě a molární koncentraci oxidačního činidla do stádia pyrazin 1-oxidu či pyrazin 1,4-dioxidu (viz schéma č. 1)<sup>51</sup>.

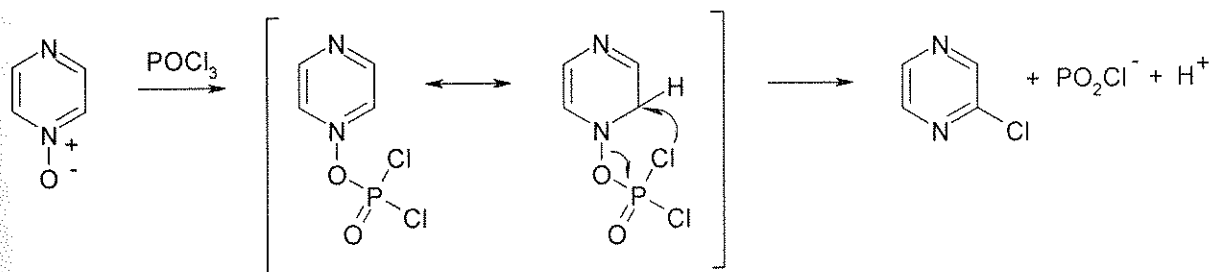
Schéma č. 1: Příprava *N*-oxidů pyrazinu pomocí peroxidu vodíku.



### 2.3. Halogenace pyrazinového jádra

Halogenpyraziny představují důležitou skupinu sloučenin v chemii derivátů pyrazinu, protože mohou poskytovat díky snadné výměně atomu halogenu za nukleofil řadu jinak nedostupných derivátů pyrazinu. Halogenderiváty pyrazinu lze připravit třemi klasickými způsoby. První metoda spočívá v přímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi, druhá pak v záměně hydroxyly či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejčastěji se halogenderiváty pyrazinu získávají nukleofilní halogenací *N*-oxidů pyrazinu. Halogenace takto aktivovaného jádra pyrazin 1-oxidu probíhá ponejvíce do polohy 2, méně pak do polohy 3. Z halogenačních činidel se nejčastěji využívá chlorid fosforylu (viz schéma č. 2).<sup>o</sup>

Schéma č. 2: Chlorace pyrazin *N*-oxidu pomocí chloridu fosforylu.



Novější poznatky v této oblasti shrnul Sato<sup>52</sup>, podle kterého místo vstupu chloru u 2-substituovaného pyrazin 4-oxidu při reakci s chloridem fosforylu je ovlivněno nejen charakterem substituentů, ale i reakční dobou. Kromě reakce 2-aminopyrazin 4-oxidu s chloridem fosforylu je ve všech ostatních případech upřednostněným produktem



2,6-disubstituovaný pyrazin. Současně však vznikají různá množství 2,3- a 2,5-disubstituovaného derivátu. Chlorpyraziny jsou cennými syntetickými intermediáty.

### 2.3. Radikálové reakce na pyrazinovém jádře

Z preparativního hlediska je významná nukleofilní substituce protonovaných heteroaromatických bazí různými typy radikálů, metody homolytických substitučních reakcí byly postupně propracovány od konce 70. let dvacátého století. Pyrazin podléhá tímto způsobem přímé radikálové alkylationi<sup>53,54</sup> (schéma č. 3), amidaci<sup>55</sup> (schéma č.4), ale také acylaci<sup>56</sup> či aroylaci<sup>57</sup>.

Schéma č. 3: Radikálová alkylatione pyrazinového jádra.

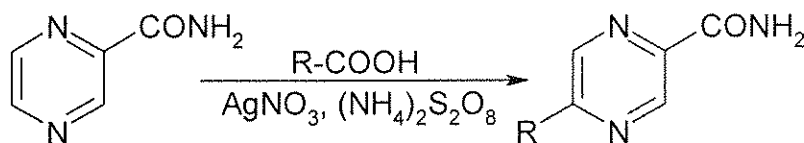
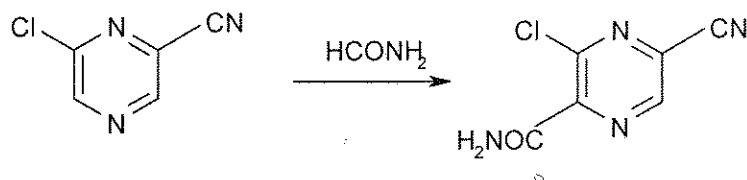


Schéma č. 4: Radikálová amidace pyrazinového jádra.



Charakter substituentu vázaného na pyrazinovém jádře rozhoduje o místě navázání dalšího substituentu. Ze studie, kterou vypracoval Houminer a spol.<sup>58</sup> vyplývá, že skupiny s +M efektem (např. -Cl, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>) upřednostňují substituci do polohy 3, a vznikají tak 2,3-disubstituované deriváty. Substituce do polohy 5 probíhá tehdy, je-li na jádře navázána skupina s -M efektem (např. -COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CONH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>). Poté vznikají 2,5-disubstituované deriváty pyrazinu.

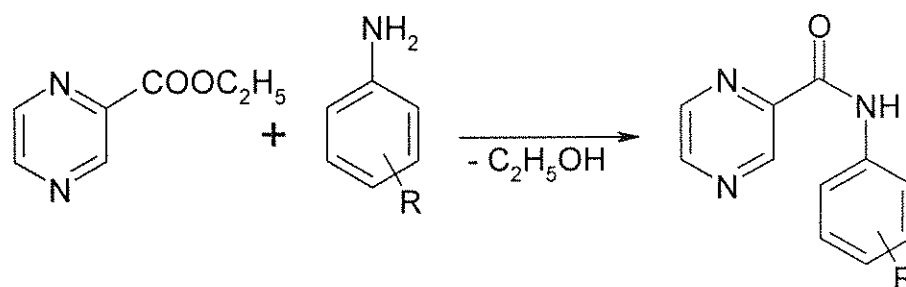
### 2.4. Příprava amidů karboxylových kyselin

Zavedení pyrazinamidu do terapie tuberkulózy podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazin-2-karboxylových kyselin, která tak představuje v chemii



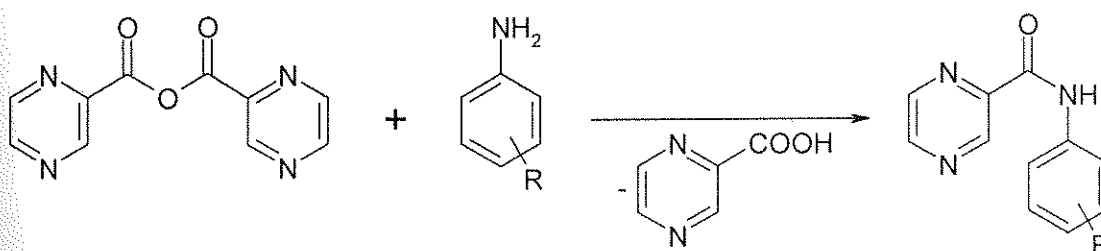
derivátů pyrazinu nejlépe prostudovanou skupinu. Ve skupině derivátů pyrazinamidu byly připraveny různě substituované mono- a diamidy pyrazinkarboxylových kyselin. Mezi klasické metody přípravy řadíme aminolýzu esterů pyrazinkarboxylových kyselin, aminolýzu anhydridů kyselin, reakci chloridu kyseliny s primárními či sekundárními aminy<sup>59</sup>, efektní parciální zmýdelnění nitrilů peroxidem vodíku při pH = 9 (tzv. Radiszewského metoda) či metodu homolytické amidace<sup>60</sup>.

#### 2.4.1. Aminolýza esterů karboxylových kyselin



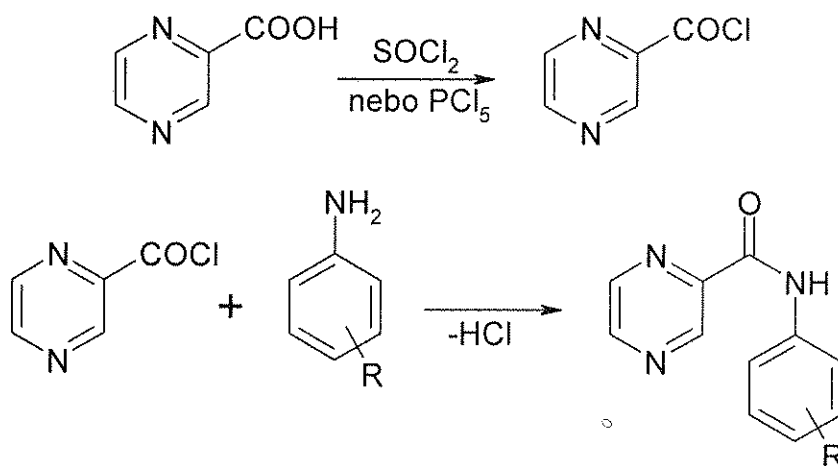
Aminolýza esterů se obvykle provádí za zvýšených teplot zahříváním směsi obou složek k varu. Velmi často je rovnováha ve prospěch amidu posouvána oddestilováním uvolňovaného alkoholu<sup>61</sup>.

#### 2.4.2. Aminolýza anhydridů karboxylových kyselin



Anhydridy karboxylových kyselin reagují s primárními aromatickými aminy za vzniku anilidů a amonných solí organických kyselin. Karboxylová kyselina neváže amin natolik pevně, aby zabránila jeho acylaci. Proto je možno při použití ekvimolárního množství anhydridu převést veškerou bázi na amid<sup>62</sup>.

### 2.4.3. Aminolýza acylchloridů karboxylových kyselin



K přípravě acylhalogenidů se používá reakce kyselin s halogenidy fosforu a síry; chloridem fosforečným a fosforitým a chloridem thionylu. Aminolýza acylchloridů a anhydridů probíhá většinou velmi hladce a je nejčastější a nejschůdnější cestou pro přípravu amidů. Uvolněný chlorovodík váže 1 mol aminu, jestliže se nepřidává k vázání kyseliny pyridinu nebo jiného terciálního aminu nebo alkalického hydroxidu<sup>63</sup>.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Přístroje a chemikálie

U všech použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty, rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna obvyklými postupy.

Teploty tání byly stanoveny na přístroji Stuart Scientific SMP3 (6212021), měřit lze současně max. 3 vzorky, teplotní rozsah do 360 °C, rozlišení 0,1°C, přesnost  $\pm 1,5$  °C, rychlost ohřevu nastavitelná 0,5-10 °C /min. Teploty tání nejsou korigovány.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím ze směsi ethanol/voda popř. methanol/voda.

Průběh reakcí a čistota produktu byly kontrolovány metodou TLC na deskách Silufol UV 254 (Kavalier, Votice). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm. Vyvíjecí soustavou pro meziproducty s karboxylovou funkční skupinou byla směs propanol:amoniak 25% = 1 : 1; pro ostatní látky ethylacetát:benzín = 1 : 1.

Elementární analýzu provedla paní V. Hronová na CHN analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano).

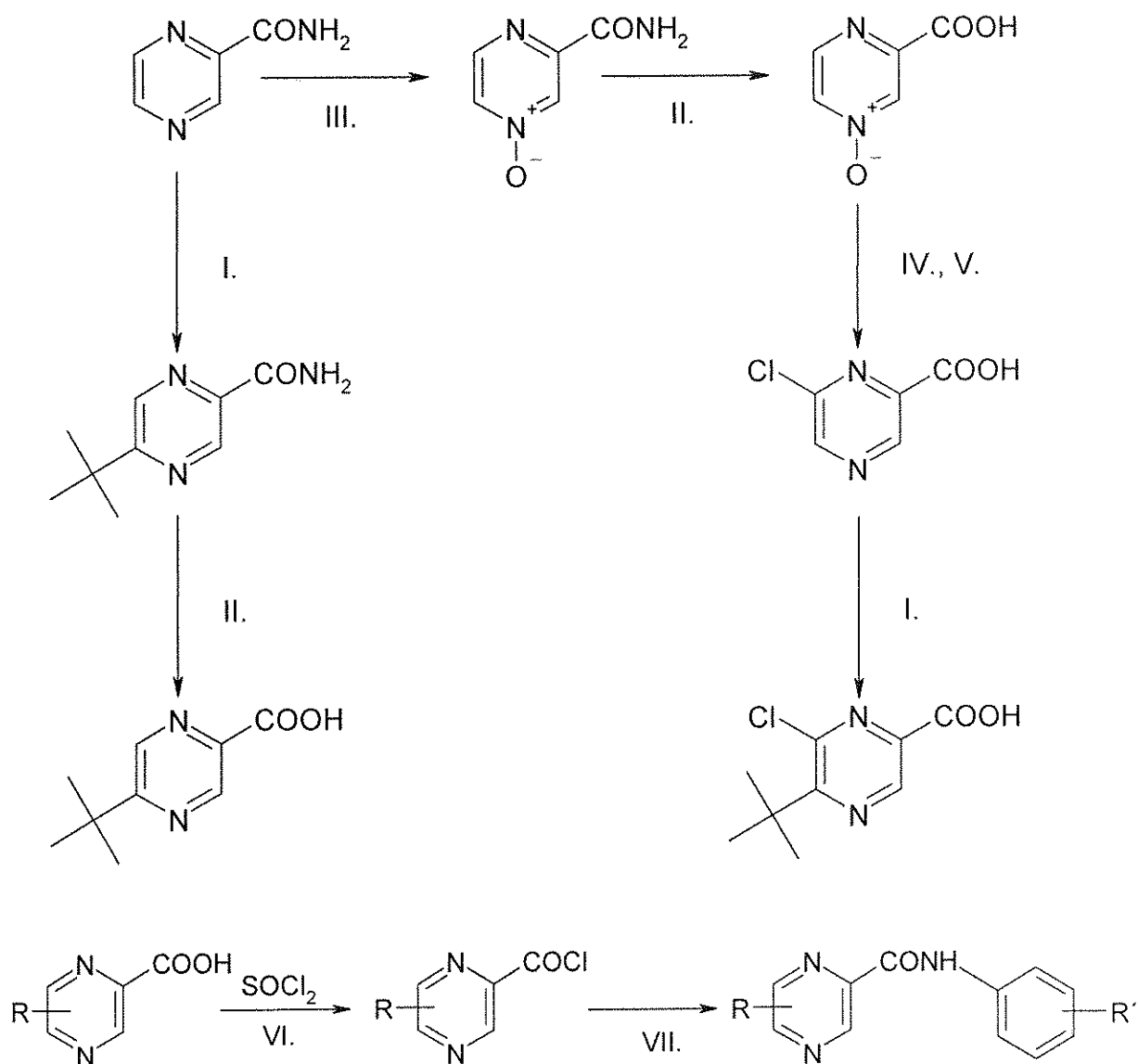
Infračervená spektra změřila paní I. Vencovská na Katedře anorganické a organické chemie na spektrometru Nicolet Impact 400. Krystalické látky byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 300 mg KBr). Vlnočty jsou uváděny v  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury – Vx BB 300 (299.95 MHz -  $^1\text{H}$  and 75.43 MHz -  $^{13}\text{C}$ ) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil Doc. PharmDr. J. Kuneš, CSc. z Katedry anorganické a organické chemie. Chemické posuny jsou vztaženy k  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ .

Log *P* sloučenin byl vypočten pomocí programu ACD/logP ver.1.0. (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto).

Příprava meziproductů je detailně popsána v Diplomové práci<sup>2</sup>.

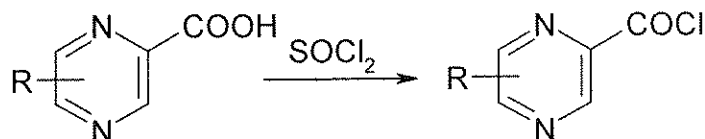
### 3.2. Schéma prováděných reakcí



- I. radikálová alkylace
- II. hydrolýza (alkalická)
- III. oxidace
- IV. halogenace (nukleofilní substituce)
- V. redukce
- VI. chlorace
- VII. aminolýza

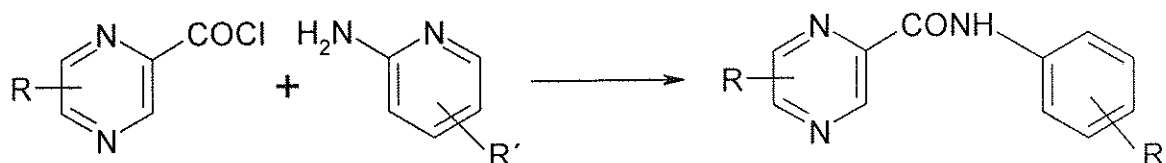
### 3.3. Obecný postup přípravy heterocyklických amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

#### 3.3.1. Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny



0,002 mol substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustí ve 20 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka je opatřena zpětným chladičem s chlorkalciovým uzávěrem proti vniknutí vzdušné vlhkosti. K roztoku se přidá 4,0 g chloridu thionylu a reakční směs je refluxována 1,5 hod. Pak se provede destilace za sníženého tlaku na vakuové odparce a produkt se zahustí do sucha. Na závěr se přidá malé množství suchého toluenu pro úplné odstranění chloridu thionylu. Surový produkt v baňce se dále nečistí a použije se ihned do další reakce.

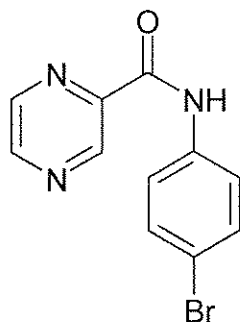
#### 3.3.2. Příprava anlidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny



V bezvodém acetonu se rozpustí 0,0014 mol heterocyklického aminu v zábrusové Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. Pak se přidá 0,11 g (0,0014 mol) suchého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce se přikapá roztok chloridu kyseliny v bezvodém acetonu. Směs je míchána za normální teploty asi jednu hodinu. Poté se rozpouštědlo oddestiluje a surový produkt se překrystalizuje ze směsi voda/ethanol popř. voda/methanol. Provede se kontrola pomocí TLC (ethylacetát:benzín = 1:1) a změří se teplota tání získaného produktu.

### 3.4. Charakteristiky jednotlivých připravených látek

#### 3.4.1. (4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



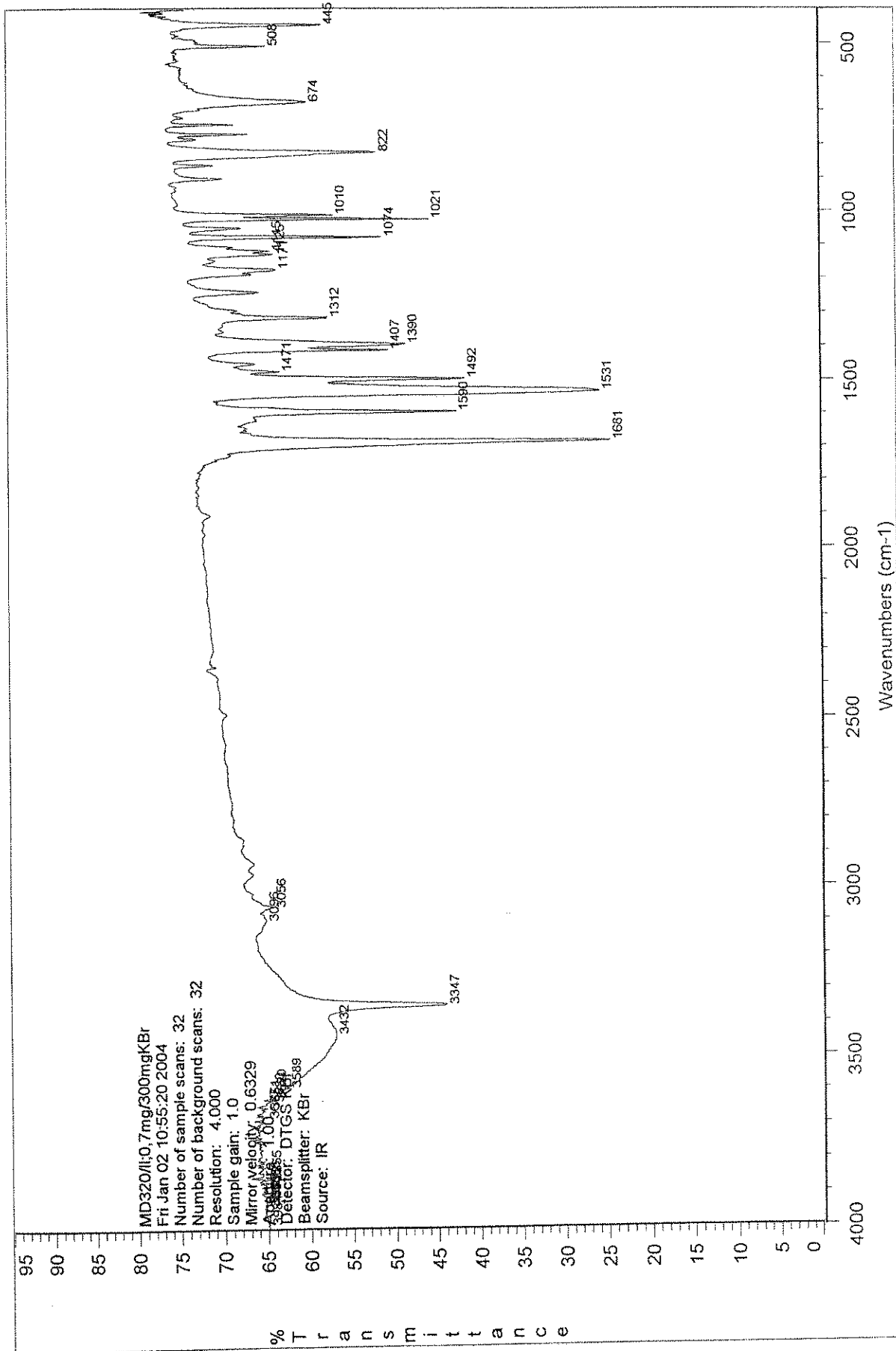
Tabulka č. 6.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	278,11			
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> OBr			
Výtěžek (výtěžnost)	70 mg (18 %)			
Teplota tání	191 – 193 °C (lit. <sup>64</sup> : 198 – 201 °C)			
R <sub>F</sub>	0,39			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	47,51 %	5,75 %	15,11 %	2,90 %
Nalezeno	47,65 %	-	14,91 %	3,05 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.68 (bs, 1H, NH), 9.50 (d, 1H, J=1.24 Hz, H3), 8.82 (d, 1H, J=2.61 Hz, H6), 8.59 (dd, 1H, J=2.61 Hz, J=1.24 Hz, H5), 7.70-7.63 (m AA', BB', 2H, H2', H6'), 7.55-7.47 (m AA', BB', 2H, H3', H5').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.6, 147.7, 144.7, 142.4, 136.3, 132.2, 121.5, 121.3, 117.5.

IČ spektrum: 3347 (NH), 1681 (CO).

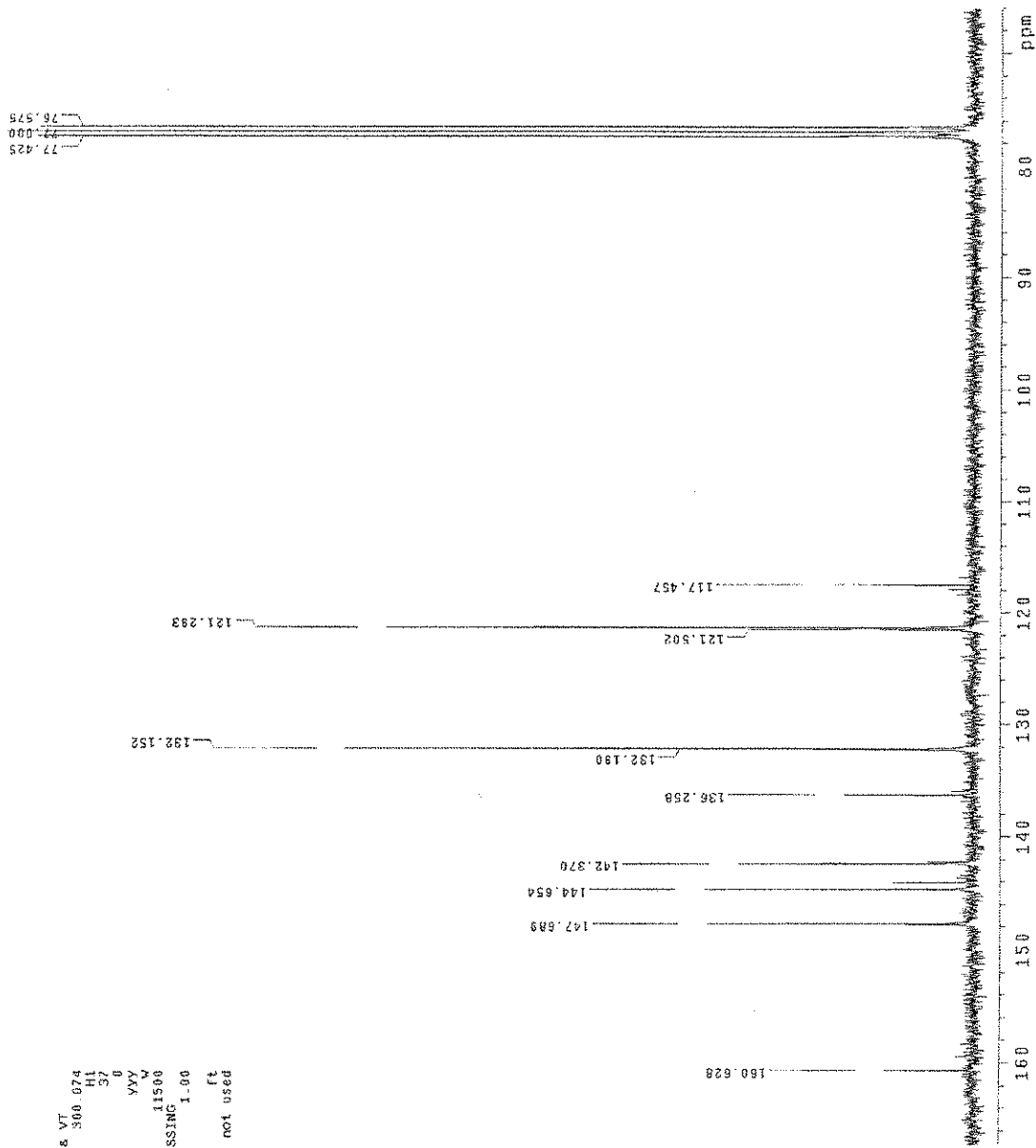


13C OBSERVE

EXPR SIC13C

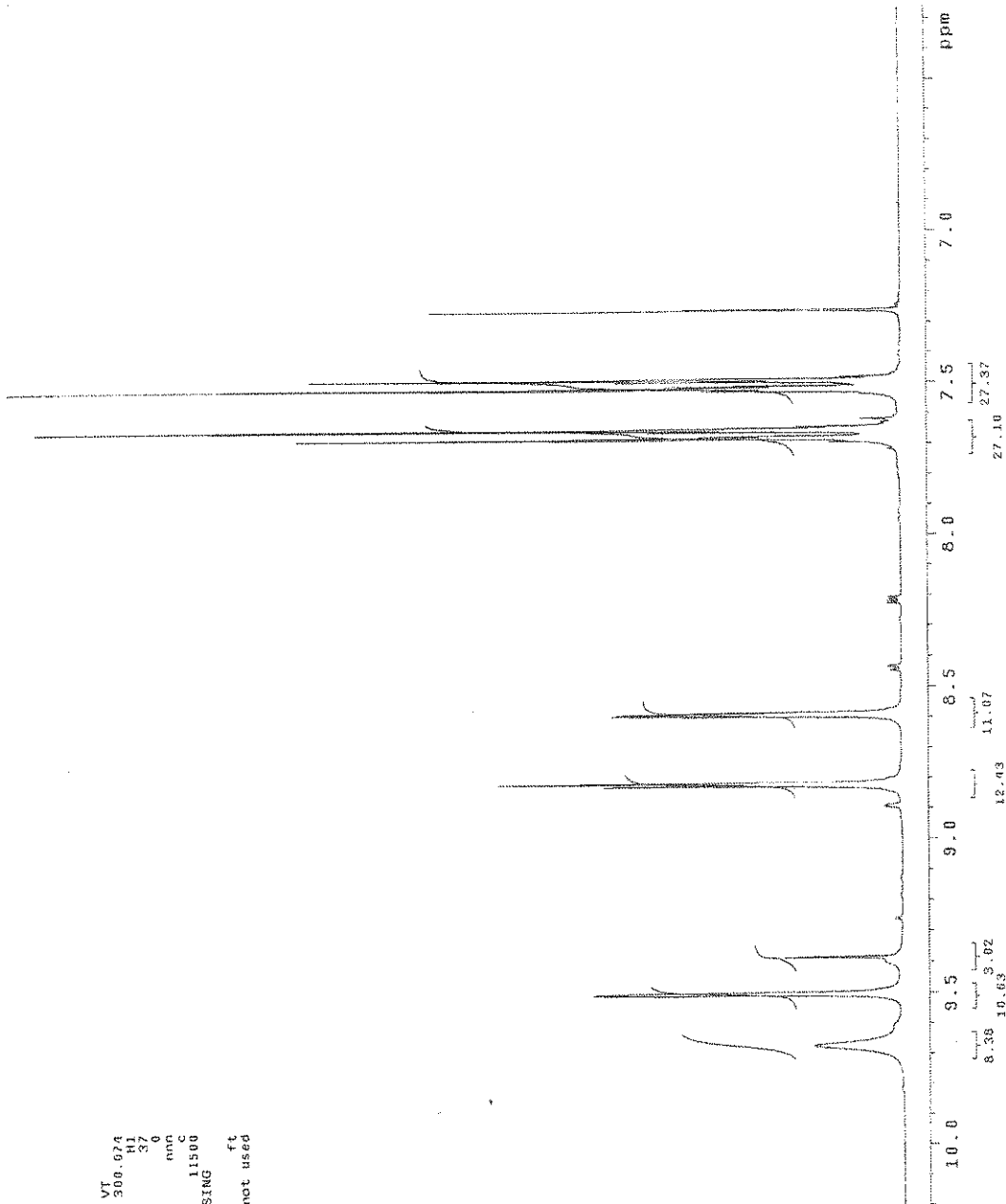
```

data Dec 10 0003 dfrq DEC. & VT
solvent CRC13 dfrq 300.074
file /export/home/~dwmf 37
vnmr1/D0122a1/MD92~dof dof 0
g-II C.fid dm vvy
ACQUISITION W
sfrq 75.461 daf 11590
in C13 lb PROCESSING
at 1.815 lb 1.00
cp 107819 wffla
pc 10400 proc ft
tc 10400 tn not used
bs 18
lwmf 50 wfff
pw 16.2 wskp
di 5.000 wbs
Lof 0 wat
nt 1024
ct 542
clock
gain not used
in p
ii n
dp y
DISPLAY
sp 4977.4
wp 7542.7
vs 17.0
vc 200
Hzmm 38.21
ls 500.00
rfi 7637.8
rfp 5809.9
ins 15
cm no ph 100.000
  
```

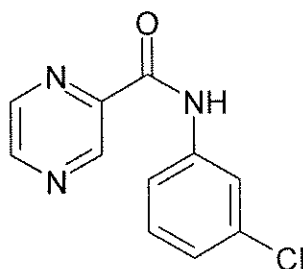




MD320-II  
 exp5 stdh  
 SAMPLE REC. & VT  
 date Dec 16 2003 dfrq 300.074  
 solvent CDCl3 dn H1  
 file /export/home/~z/ cpwr 30  
 vnmr1/0008111\_H1.F10 dm nnn  
 ACQUISITION H1.F10 c  
 sfrq 300.074 dmf 11500  
 tn H1  
 at 1.888 wtf1e ft  
 ap 1.888 wtf1e ft  
 fb 45000 fh not used  
 bs 2600  
 bs 16 werr  
 tpwr 54 wekp  
 pw 7.0 wbs  
 dj 5.000 wnt  
 hf 16  
 ht 16  
 ct 16  
 alock n  
 gain not used  
 FLAGS  
 ll n  
 in n  
 dp y  
 DISPLAY  
 sp 1878.5  
 wf 1182.6  
 xs 17.0  
 ac 208  
 hzmm 5.91  
 is 390.00  
 rfi 2884.1  
 lfp 2170.20  
 ins  
 nm cdc ph 109.080



### 3.4.2. (3-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



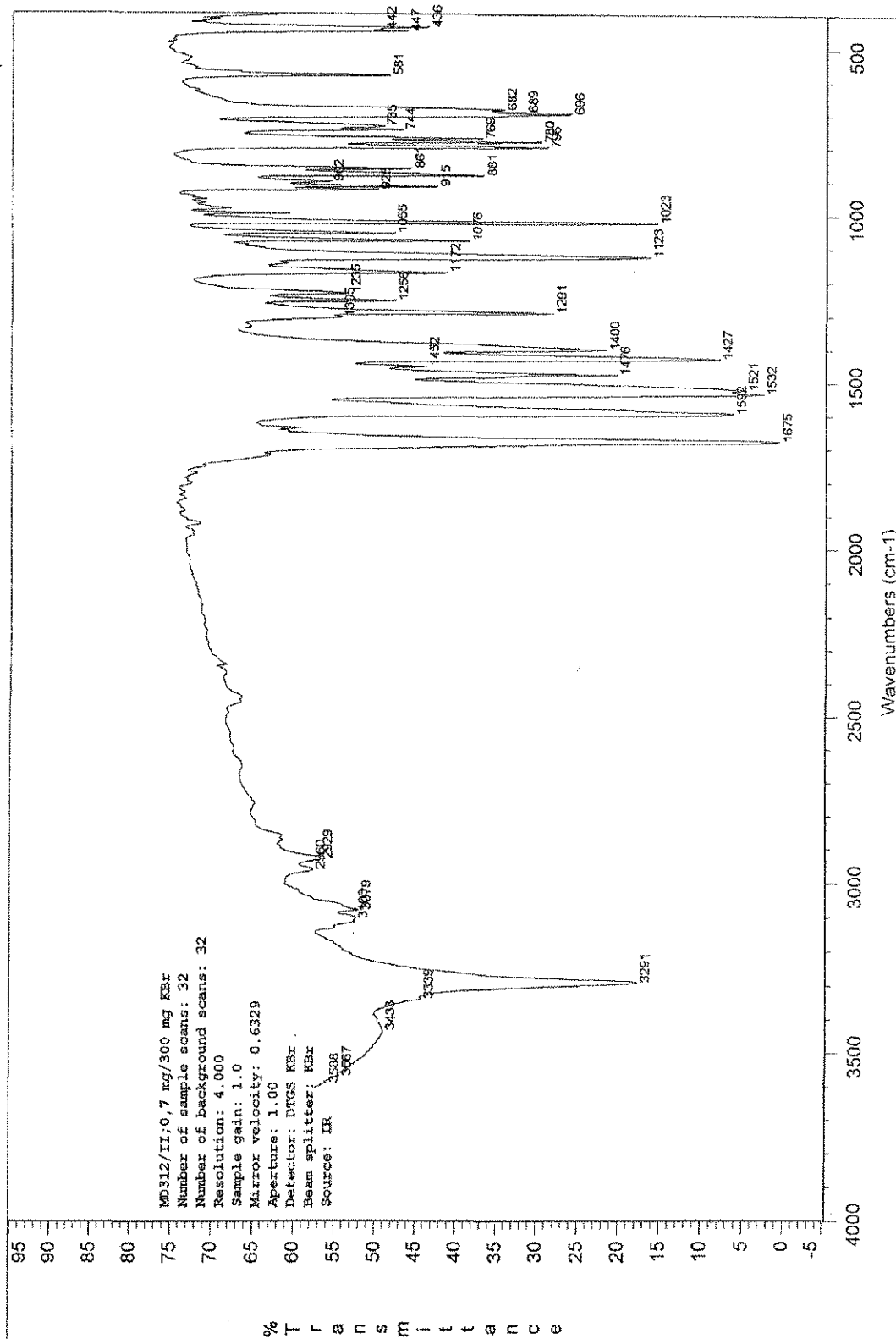
Tabulka č. 7.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	233,66			
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> OCl			
Výtěžek (výtěžnost)	150 mg (42,8 %)			
Teplota tání	139 – 140 °C (lit. <sup>65</sup> : 145 – 147 °C)			
R <sub>F</sub>	0,38			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	56,55 %	6,85 %	17,98 %	3,45 %
Nalezeno	57,06 %	-	17,37 %	3,85 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.68 (bs, 1H, NH), 9.50 (s, 1H, H3), 8.83 (d, 1H, J=2.19 Hz, H6), 8.62-8.57 (m, 1H, H5), 7.92-7.86 (m, 1H, H2'), 7.65-7.56 (m, 1H, H6'), 7.31 (t, 1H, J=1.97 Hz, H5'), 7.18-7.11 (m, 1H, H4').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160.7, 147.7, 144.7, 144.0, 142.4, 138.3, 134.8, 130.2, 124.9, 119.9, 117.7.

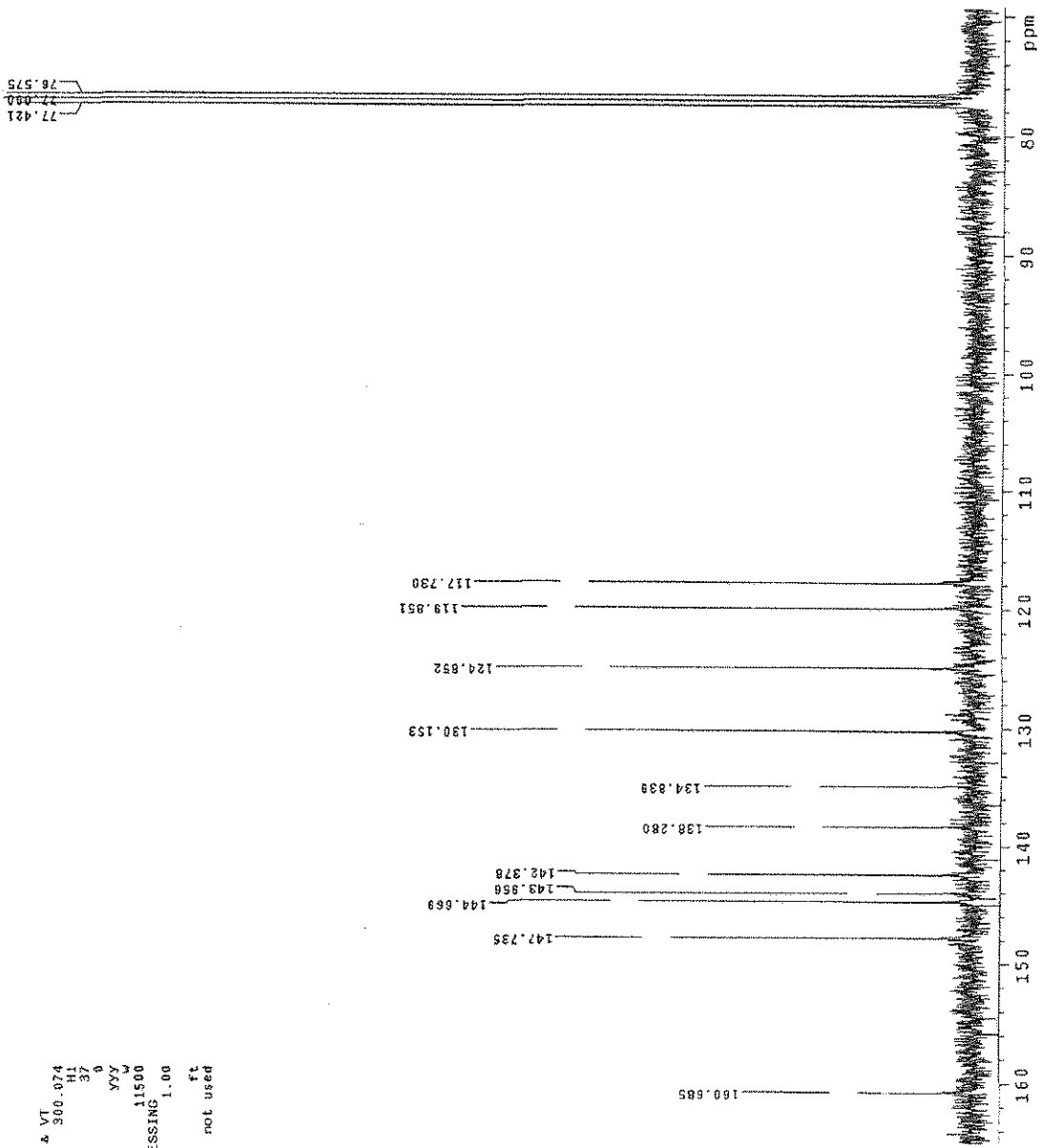
IČ spektrum: 3291 (NH), 1675 (CO).



MD312-II

exp8 std13c

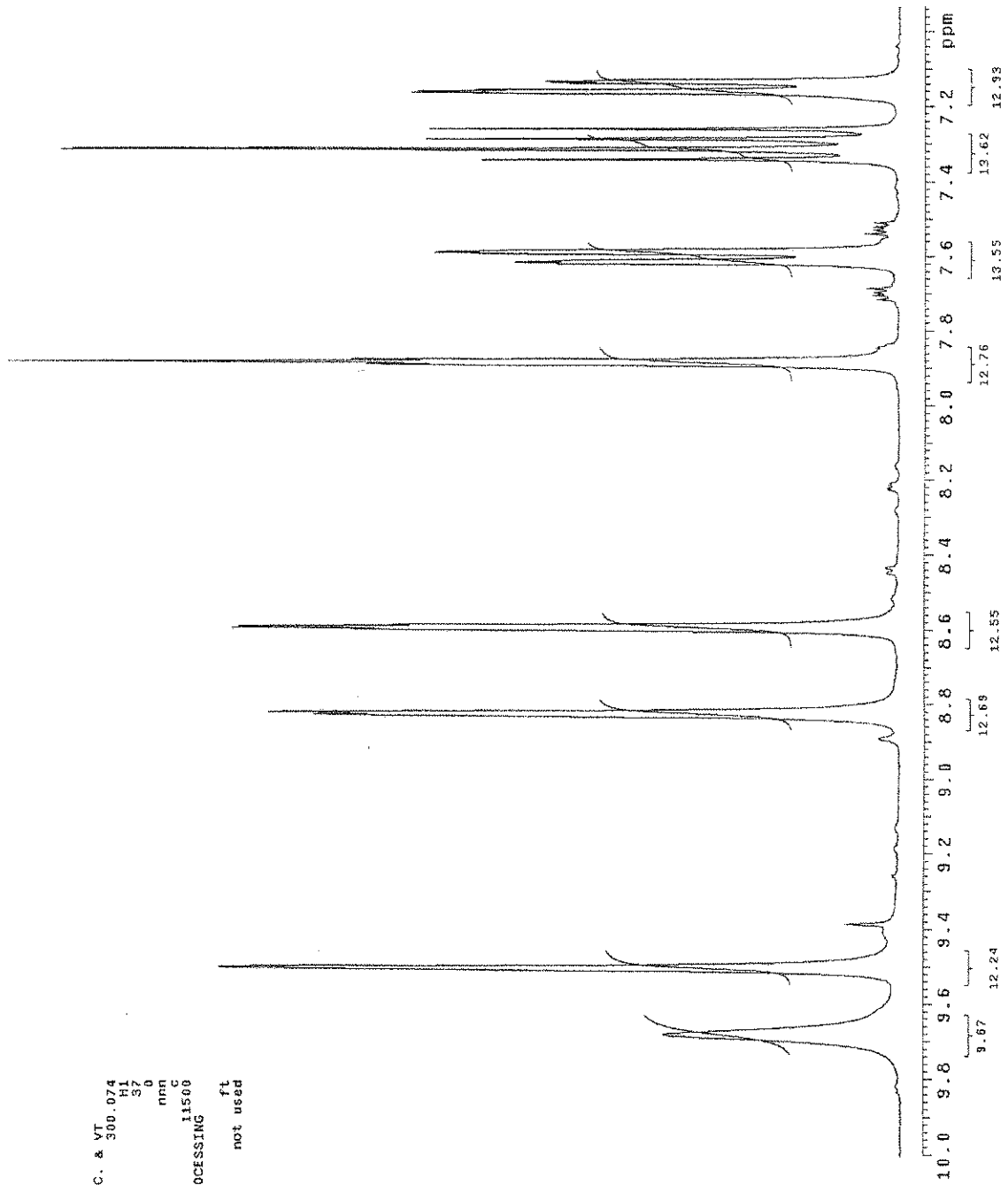
SAMPLE DEC. & VT  
date Dec 16 2003 dfrq 300.074  
solvent CDCl3 dn H1  
file /export/home/~dpwr 37  
vnmf/doleza/MD31- not 0  
procfile /procfile  
xyy  
ACQUISITION  
sfrq 75.061 dnm 11500  
in 1.815 lb dmF PROCESSING 1.00  
at 68106 wffile ft  
sw 18761.7 pF0C not used  
fb 10400 fu  
bs 16  
tpwr 50 werr  
pw 18.2 wexp  
pv 5.000 wss  
Tof 1024 wnt  
ct 113  
elock s  
gain not used  
FLAGS  
ll n n  
in n n  
cp DISPLAY y  
\$D 5223.6  
wD 7223.6  
vD 178  
sC 0  
wC 200  
Hzmm 36.12  
IS 500.00  
F1 7837.3  
F2 50851.9  
F3  
fns 100.008  
nm no ph



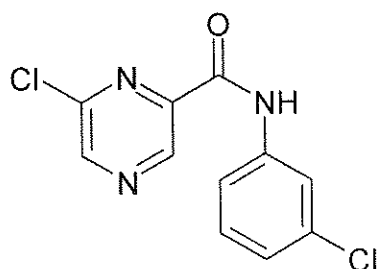
```

MD312-II
exp5 std1h
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 16 2003 dfrq 300.074
solvent CDC13 dn H1
file /export/home/~ dbrw 37
vnmr1/DoIezai/MD31~ dof 0
-ii- h. fid dm nmh
ACQUISITION 11500 C
sfrq 300.074 dmr PROCESSING
tn 1-898 wifile
at 17884 proc
np 4500.5 fn not used
fb 2500
bs 18 werr
tpwr 54 wexp
pw 7.0 wbs
ctf 16
ct 16
alock not used
gain not used
flags n
il n
in n
dp y
SP DISPLAY 2679.6
VP 322.5
VS 170
SC 200
WC 200
hzmm 4.51
ls 800.00
rfi 2834.1
rfp 2176.5
th 100.00
lms cdc ph 180.000

```



### 3.4.3. (3-chlorfenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



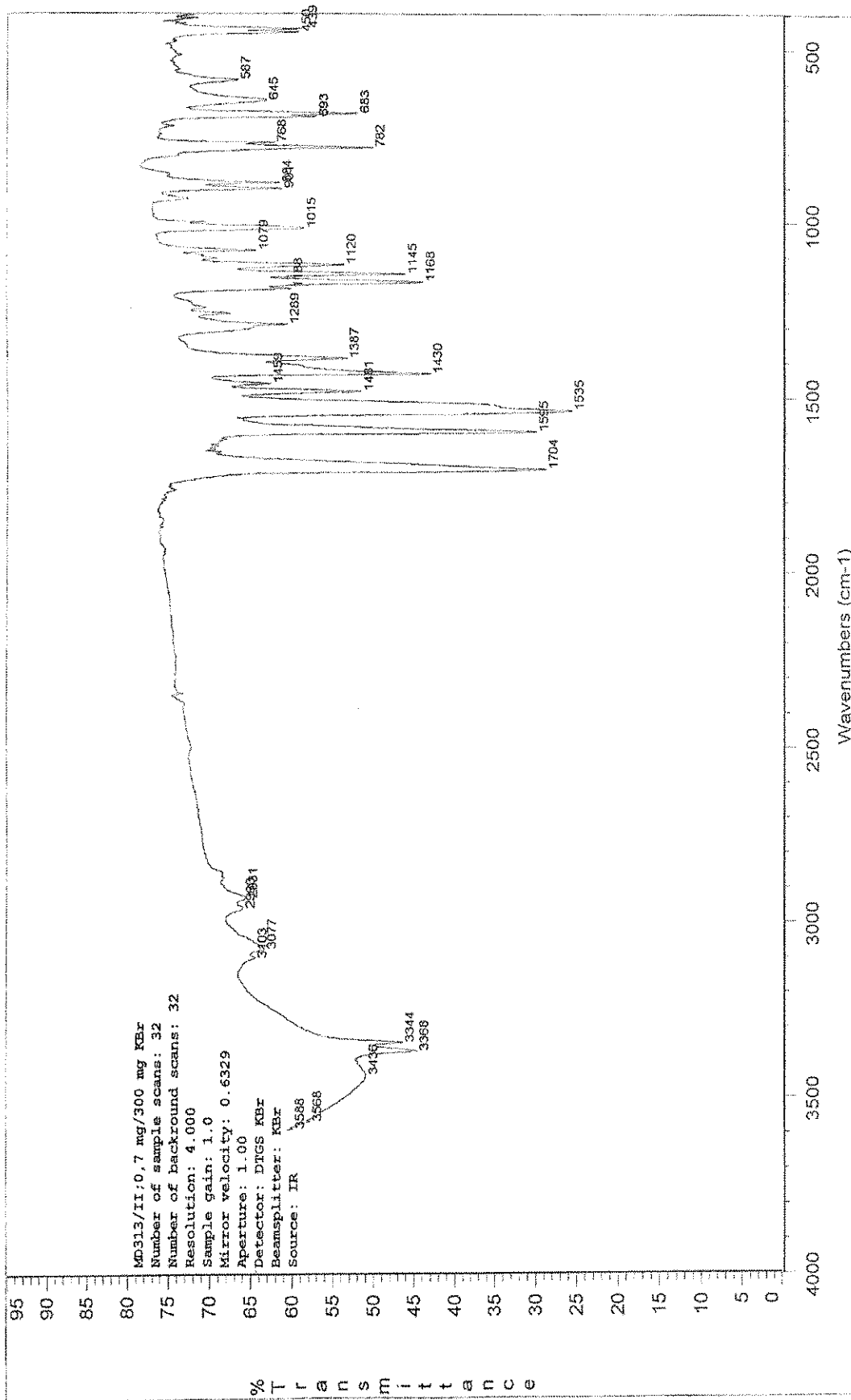
Tabulka č. 8.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	268,10			
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>2</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	340 mg (90,7 %)			
Teplota tání	106 – 108 °C			
R <sub>F</sub>	0,86			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	49,28 %	5,97 %	15,67 %	2,63 %
Nalezeno	50,10 %	-	15,14 %	3,02 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.44-9.35 (m, 2H, NH, H3), 8.82 (s, 1H, H5), 7.88 (t, 1H, J=1.93 Hz, H2'), 7.60 (ddd, 1H, J=7.97 Hz, J=1.93 Hz, J=0.83 Hz, H6'), 7.32 (t, 1H, J=7.96 Hz, H5'), 7.17 (ddd, 1H, J=7.97 Hz, J=1.92 Hz, J=0.82 Hz, H4').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.4, 147.8, 147.5, 143.6, 142.2, 137.9, 134.9, 130.2, 125.2, 120.1, 118.0.

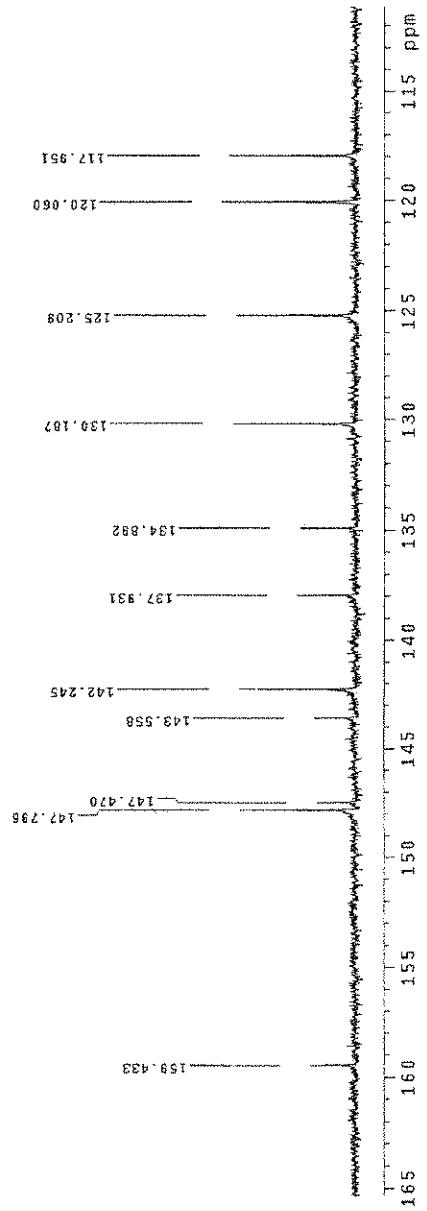
IČ spektrum: 3368 (NH), 1704 (CO).



MD-313-II

exp5 std13c

```
SAMPLE      DEC. & VT
date      Dec 16 2003      dfrq      300.074
solvent    CDC13          dn          37
file       /export/home/~  apwr          0
vnmr1/Reaan/MD-313~
  II_C.fid  dm          yvv
ACQUISITION 75.461      dnm          11500
  sfrq      dmf      PROCESSING 1.00
  at        1.815      lb
  mp        68106      wiffite
  sw        18761.7    proc          ft
  fb        10400      fn          not used
  bs        16
  tpwr      50          werr
  pw        16.2       wexp
  di        5.000      wbs
  tof       1024
  ct        80
  stock     s
  gain      not used
  FLAGS
  ll        n
  fn        n
  dp        y
  DISPLAY
  sp        6864.5
  vp        4896.4
  vc        58
  sc        0
  wc        200
  hznm      20.45
  is        588.00
  rfl       7636.7
  rfp       5809.3
  th
  rms       100.000
  rm        NO
  ph
```





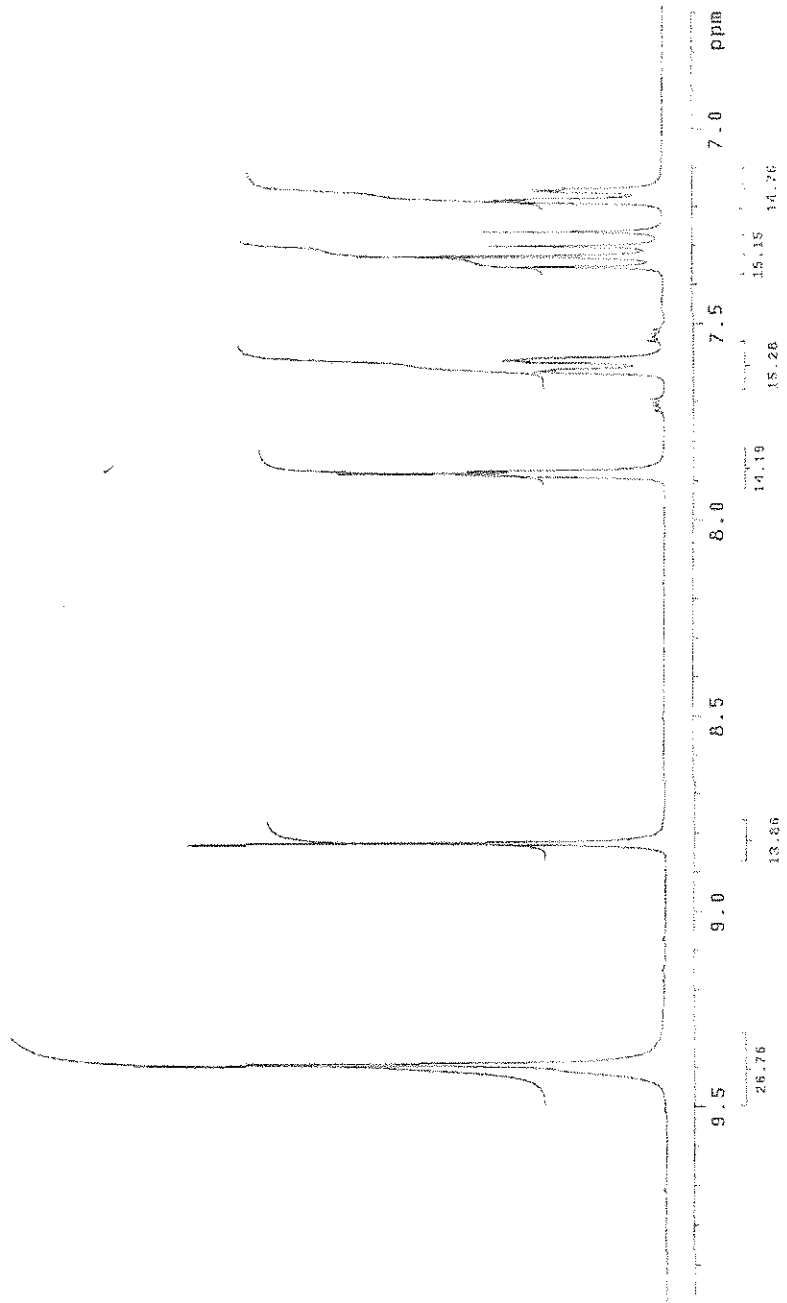
MO-313-11

exp5 stdh

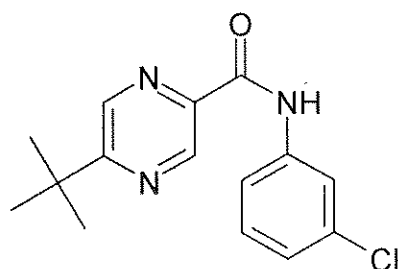
```

SAMPLE DEC. & VI
date dec 16 2003 dfrq 300.074
file 17884 d1
format exp5_17884 d1
vamp1/Radon/HD-313~ 20f 0
      -11.H.fid da pnn c
ACQUISITION dnm 11500
sfrq 300.074 dmf PROCESSING
tn H1
at 1.398 wfile
np 17884 proc fi
sw 4500.5 fn not used
tr 2006
tpwr 54 wprt
dl 7.0 wrs
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 16
ct 16
alock n
gain not used
flags n
il n
in n
dp n
sp 2002.7
wp 993.3
v5 89
SC 300
vc 4.87
kmm 1166.74
rfi 2884.1
rfp 2178.5
th 20
irs 100.000
na cdc ph

```



### 3.4.4. (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



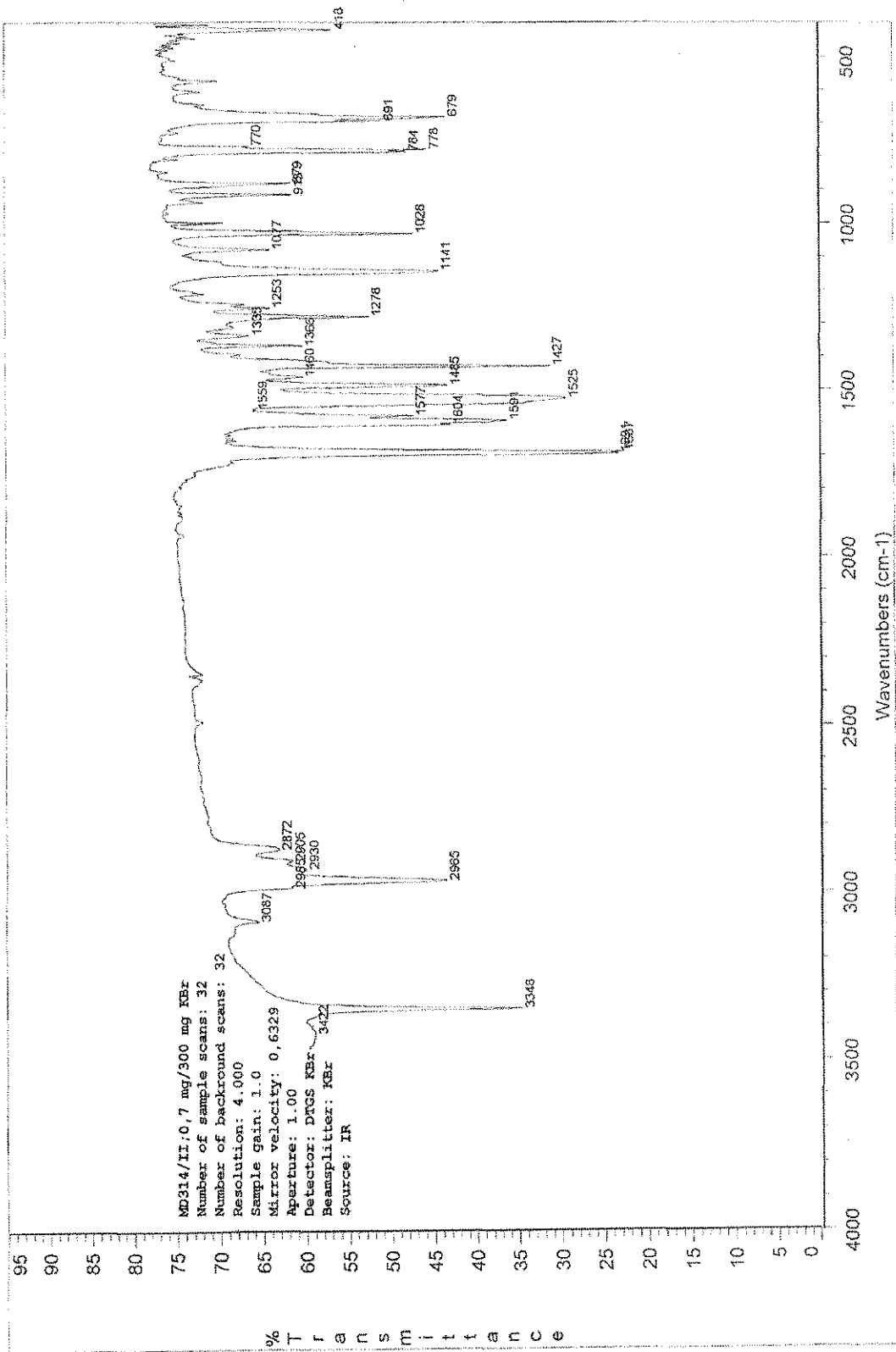
Tabulka č. 9.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	289,77			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> OCl			
Výtěžek (výtěžnost)	335 mg (82,5 %)			
Teplota tání	115 – 118 °C			
R <sub>F</sub>	0,86			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	62,18 %	5,52 %	14,50 %	5,57 %
Nalezeno	62,38 %	-	13,78 %	5,94 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.67 (bs, 1H, NH), 9.38 (d, 1H, J=1.37 Hz, H3), 8.62 (d, 1H, J=1.37 Hz, H6), 7.89 (t, 1H, J=2.07 Hz, H2'), 7.59 (ddd, 1H, J=7.96 Hz, J=2.07 Hz, J=1.10 Hz, H4'), 7.30 (t, 1H, J=7.96 Hz, H5'), 7.13 (ddd, 1H, J=7.96 Hz, J=2.07 Hz, J=1.10 Hz, H6'), 1.45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.0, 161.1, 143.0, 141.0, 139.0, 138.5, 134.8, 130.1, 124.6, 119.8, 117.6, 37.1, 29.7.

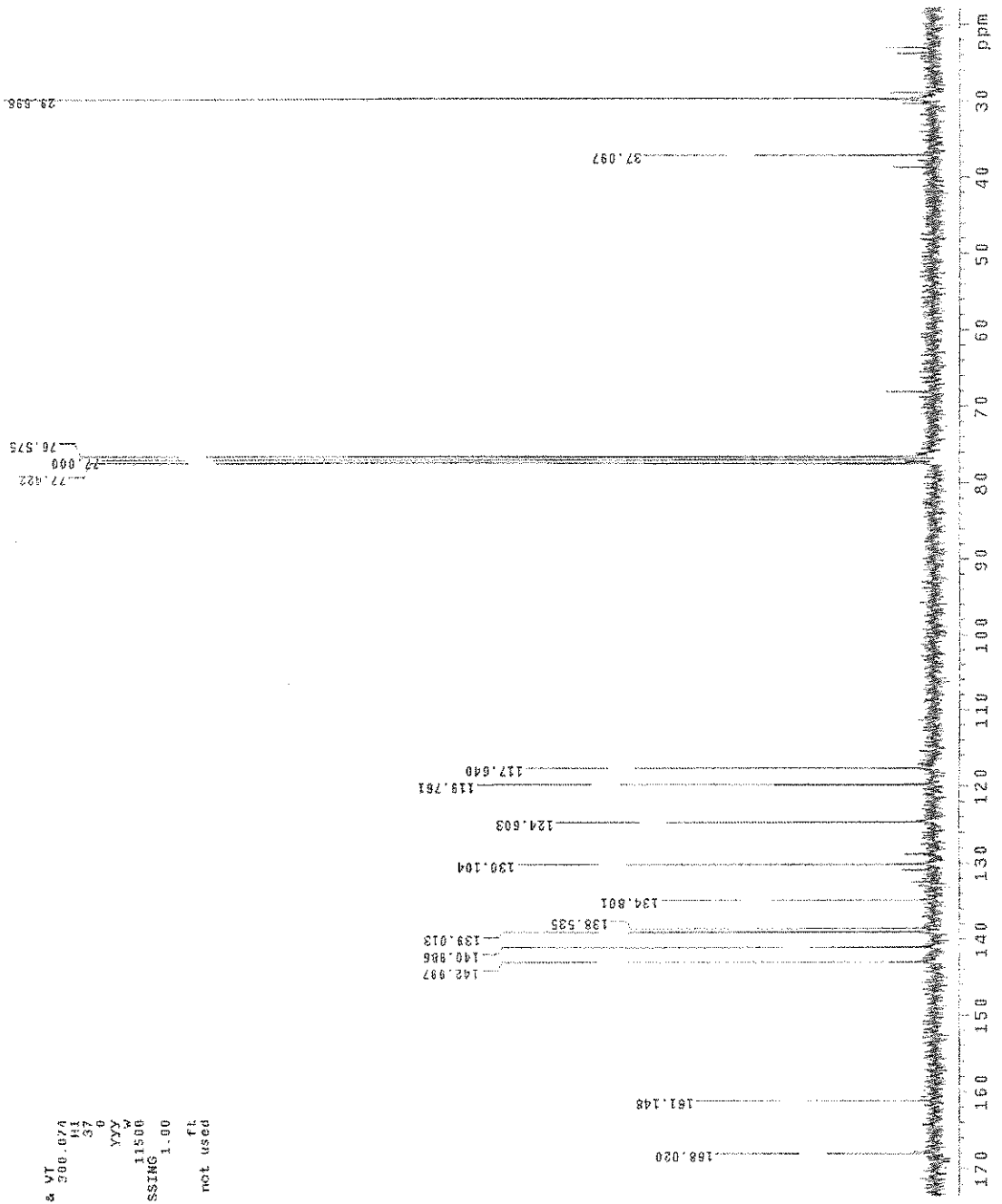
IČ spektrum: 3348 (NH), 1687 (CO).



```

ND314-II
exp6 std13c
SAMPLE DEC. & VI
date Dec 16 2083 cfrq 300.0VA
solvent CDC13 dn HI
file /export/home/~ dpwr 37
vnmr1/Doieza/ND314.dof dof 0
4-11-C.fid dm YYY
ACQUISITION dmp 11506
75.461 dmf
SU 1.812 lb PROCESSING
PU 68106 wfile 1.00
SW 18781.7 PROC fl
FB 10400 fn not used
BS 16
tpwr 50 weir
pw 16.2 wep
DI 5.000 wbs
LoF 0 wnt
nt 1024
clock 232
gain not used
ll n
in n
in n
dp n
SP 1328.7
SS 11753.6
SC 170
PC 200
h2mm 58.80
ls 506.00
fFl 7636.6
cFf 5866.5
th 100.000
ins no ph

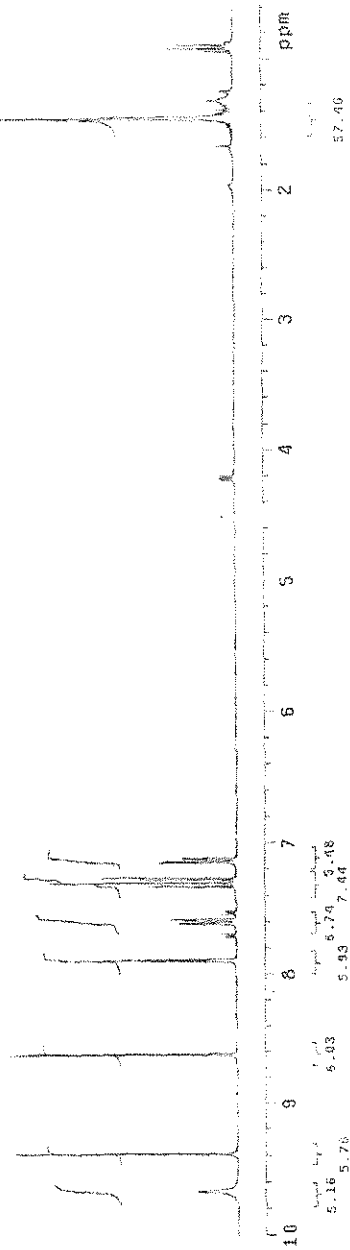
```



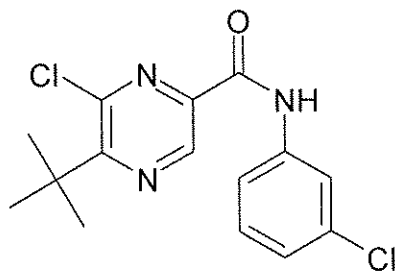
```

M0314-II
exp5 stdih
SAMPLE DEC. 4 VI
date Dec 16 2003 dfrq
solvent CDC13 dn
file /R0021/0003/400w ddr
vnmr2/00021/0003/400w ddr
nmr 4-II H.Fid do nna C
ACQUISITION dmf 11503
sfrq 300.074 dmf 11503
IN HI
at 1.988 wfile
mp 1.784 proc
pw 40000 th not used
RG 2000
B0 18 warr
tprw 54 wexp
pw 7.0 wbs
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 16
clock 16
grain not used
FLAGS n
I1 n
in n
dp y
DISPLAY 175.0
V0 2626.7
V5 532
SC 0
WC 200
hZmm 14.13
V5 800.00
rfi 2008.1
th 2176.5
ins 100.000
nm cdc ph

```



### 3.4.5. (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



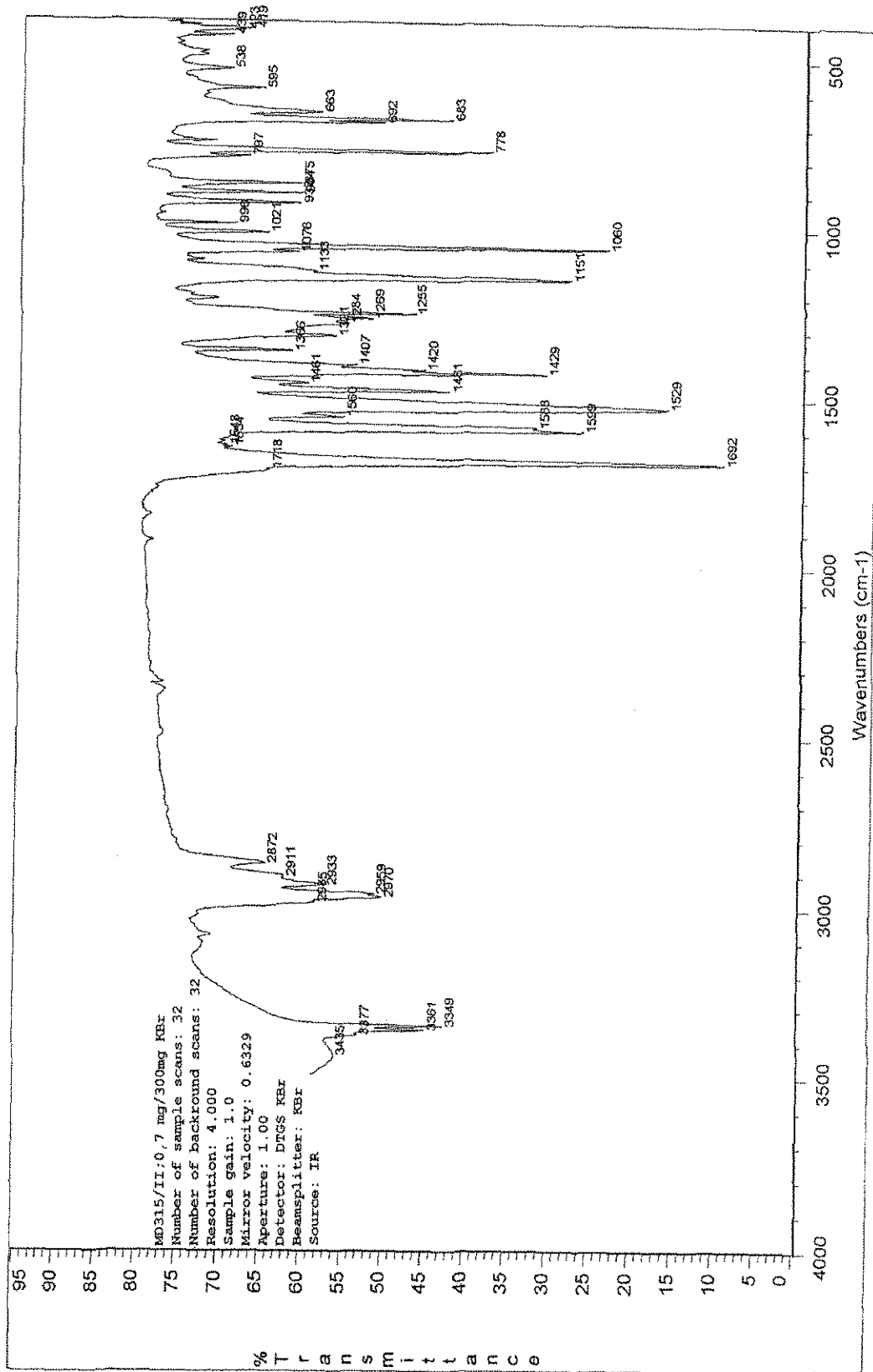
Tabulka č.10.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	324,21			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>2</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	440 mg (97,1 %)			
Teplota tání	86 – 87 °C			
R <sub>F</sub>	0,94			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	55,57 %	4,93 %	12,96 %	4,66 %
Nalezeno	56,02 %	-	12,50 %	5,15 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.39 (bs, 1H, NH), 9.26 (s, 1H, H3), 7.88 (t, 1H, J=2.07 Hz, H2'), 7.60(ddd, 1H, J=7.97 Hz, J=2.07 Hz, J=1.10 Hz, H6'), 7.31 (t, 1H, J=7.97 Hz, H5'), 7.15 (ddd, 1H, J=7.97 Hz, J=2.07 Hz, J=1.10 Hz, H4'), 1.55 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 164.9, 159.9, 145.8, 140.7, 140.3, 138.2, 134.8, 130.1, 125.0, 120.0, 117.9, 39.0, 28.20.

IČ spektrum: 3349 (NH), 1692 (CO).



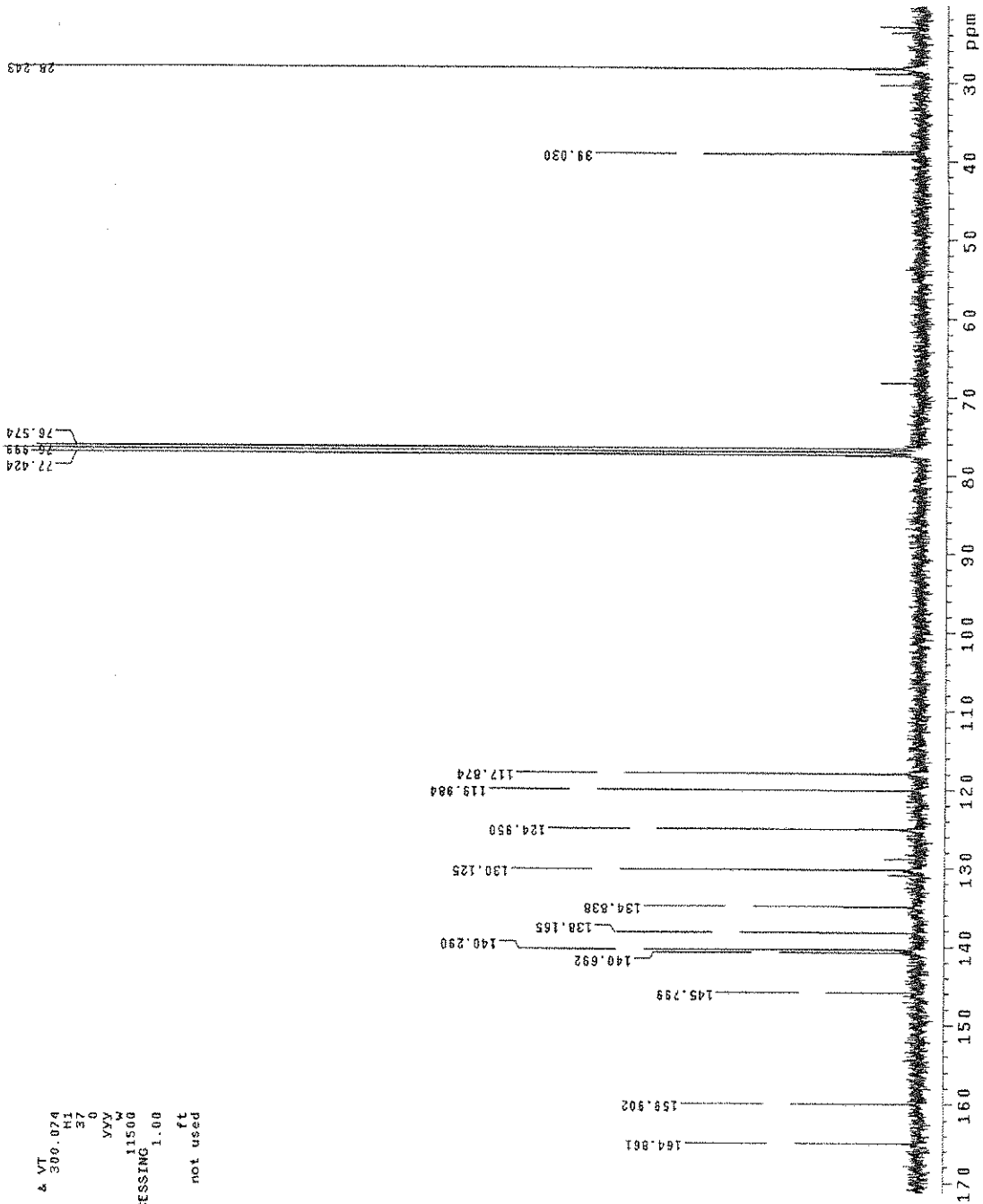
MD315-II

exp6 std13c

```

SAMPLE          DEC. & VT
date Dec 16 2003 dfrq 300.074
file export/DCI3 dn
vmar1/Dejeza1/MD315~ ddf 30
S-II C.fid dm yyy W
ACQUISITION    dnm 11500 W
sfrq 75.461 dmf
tr C13 lb PROCESSING
at 1.815 lb 1.00
np 58106 wfile
pw 18761.7 proc ft
bs 10416 fn not used
tpwr 50 werr
pw 16.2 wexp
dl 5.000 wds
tof 0 wnt
nt 1024
ct 272
alock $
gain not used
fl R
in Y
dp DISPLAY
sp 1525.9
wp 11390.2
vs 170
sc 0
wc 200
hzmm 56
fzmm 300.05
rfi 7836.7
rff 5809.9
th 16
ins 100.000
na no ph

```





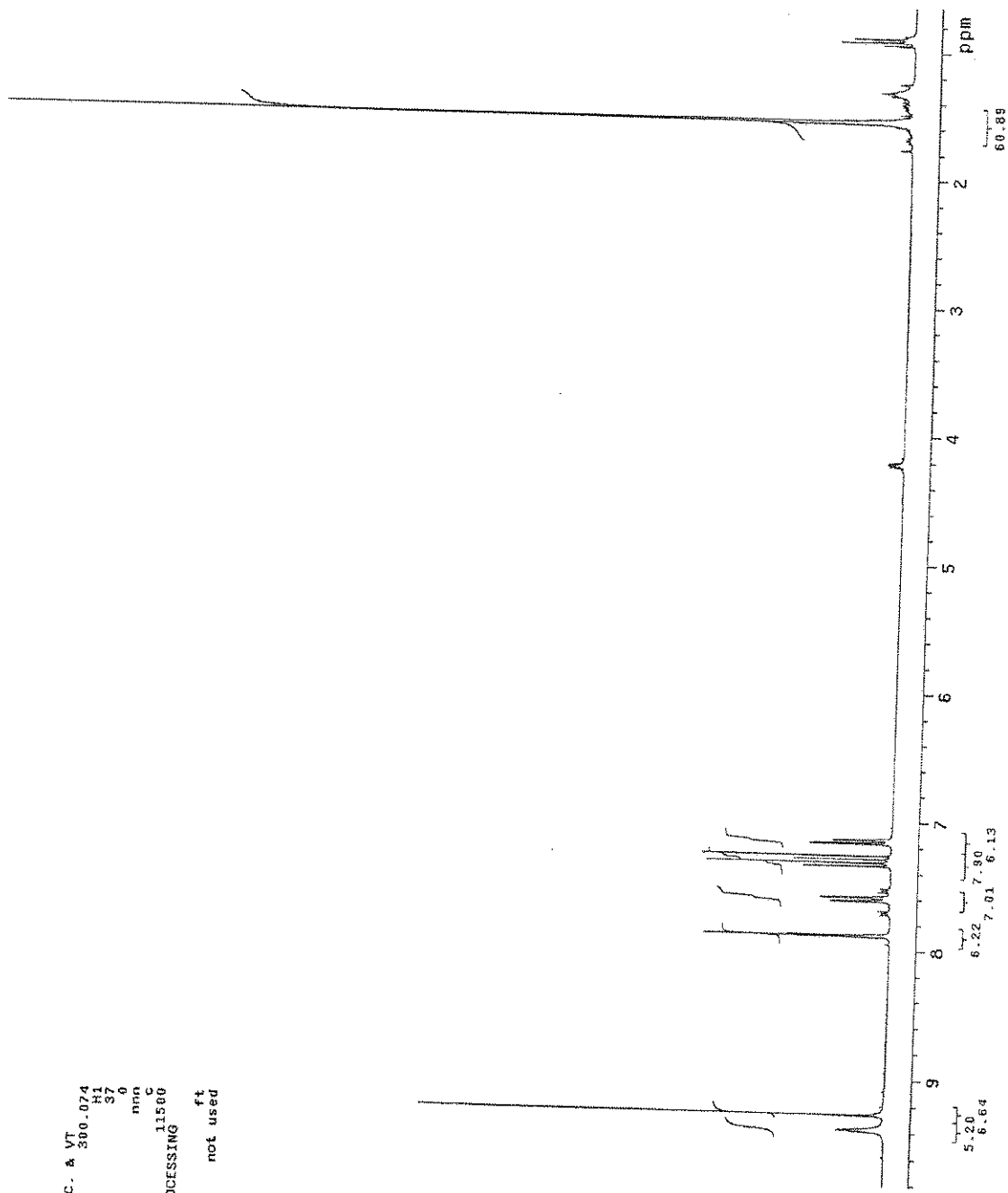
MD315-II

exp5 stdih

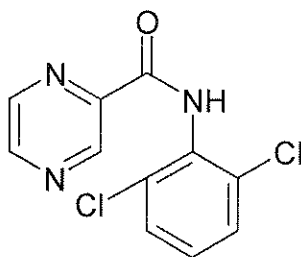
```

SAMPLE          DEC. & VT
-----
date Dec 16 2083 dfrq
file CDC13 an
vnmr1/DOCK/NAME/~ dpr 37
S-II/MSI~ 0
nmr ACQUISITION nnn
          11500
sfrq 300.074 dnr PROCESSING
at 1.898 wfile
np 17884 proc ft
fw 4500.5 fn not used
bs 2600
tpwr 16 werr
pw 74 wekp
di 7.00 WDS
tof 5.000 wnt
nt 15
ct 16
alock n
gain not used
ll n
in n
dp n y
DISPLAY 183.2
sp 2749.8
vs 640
sc 0
mc 200
lcmm 13.75
rf1 780.08
rfp 2084.1
th 2176.2
ins 100.000
nm cdc ph

```



### 3.4.6. (2,6-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



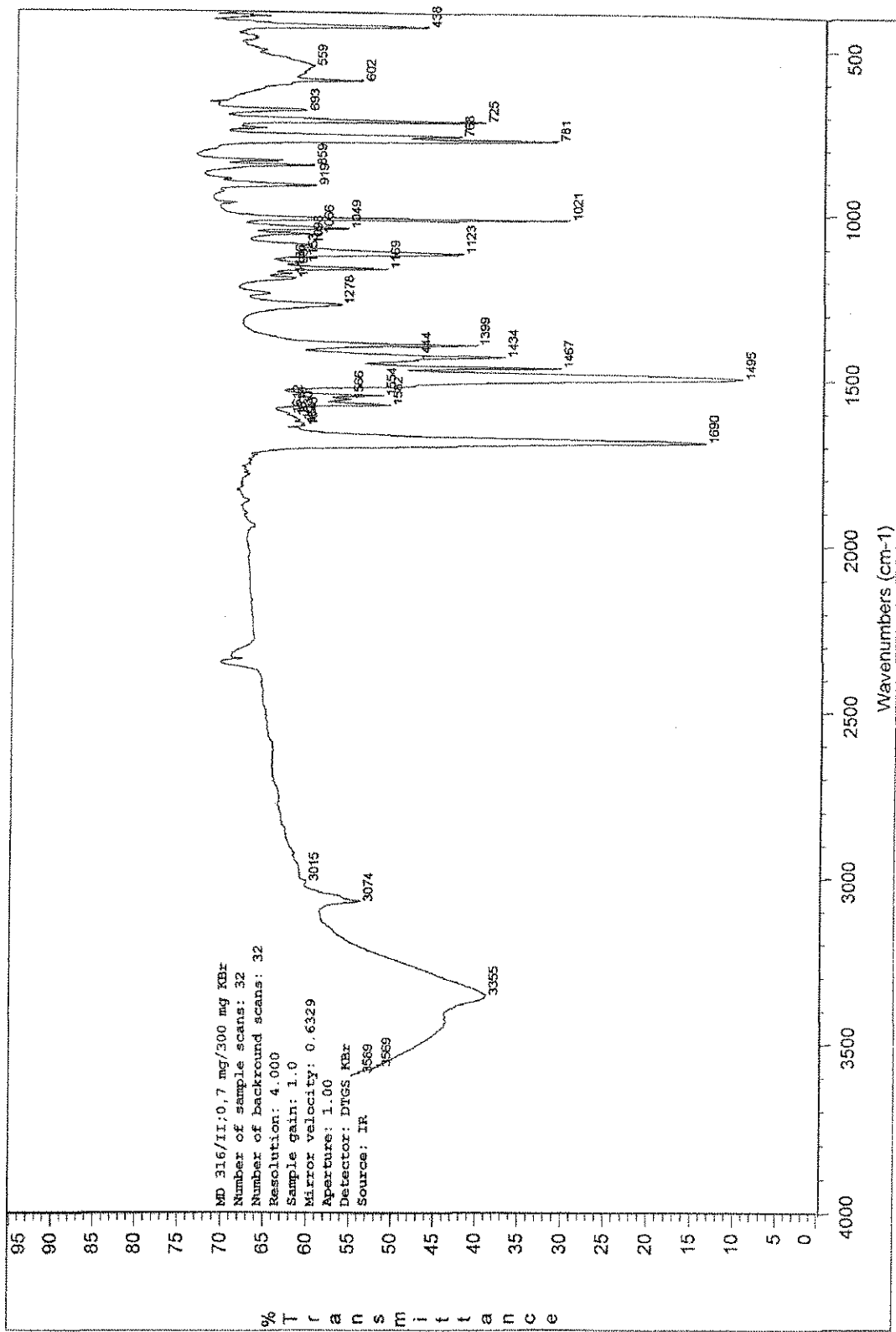
Tabulka č. 11.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	268,10			
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>2</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	90 mg (24,0 %)			
Teplota tání	151 – 152 °C			
R <sub>F</sub>	0,53			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	49,28 %	5,97 %	15,67 %	2,63 %
Nalezeno	49,51 %	-	15,21 %	2,68 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,51 (bs, 1H, NH), 9,41 (s, 1H, H3), 8,85 (s, 1H, H5), 8,75 (s, 1H, H6), 7,10-7,61 (m, 3H, H3', H4', H5').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 160,8, 147,8, 144,8, 142,7, 134,2, 133,5, 132,4, 129,8, 128,8, 128,5 a 123,5.

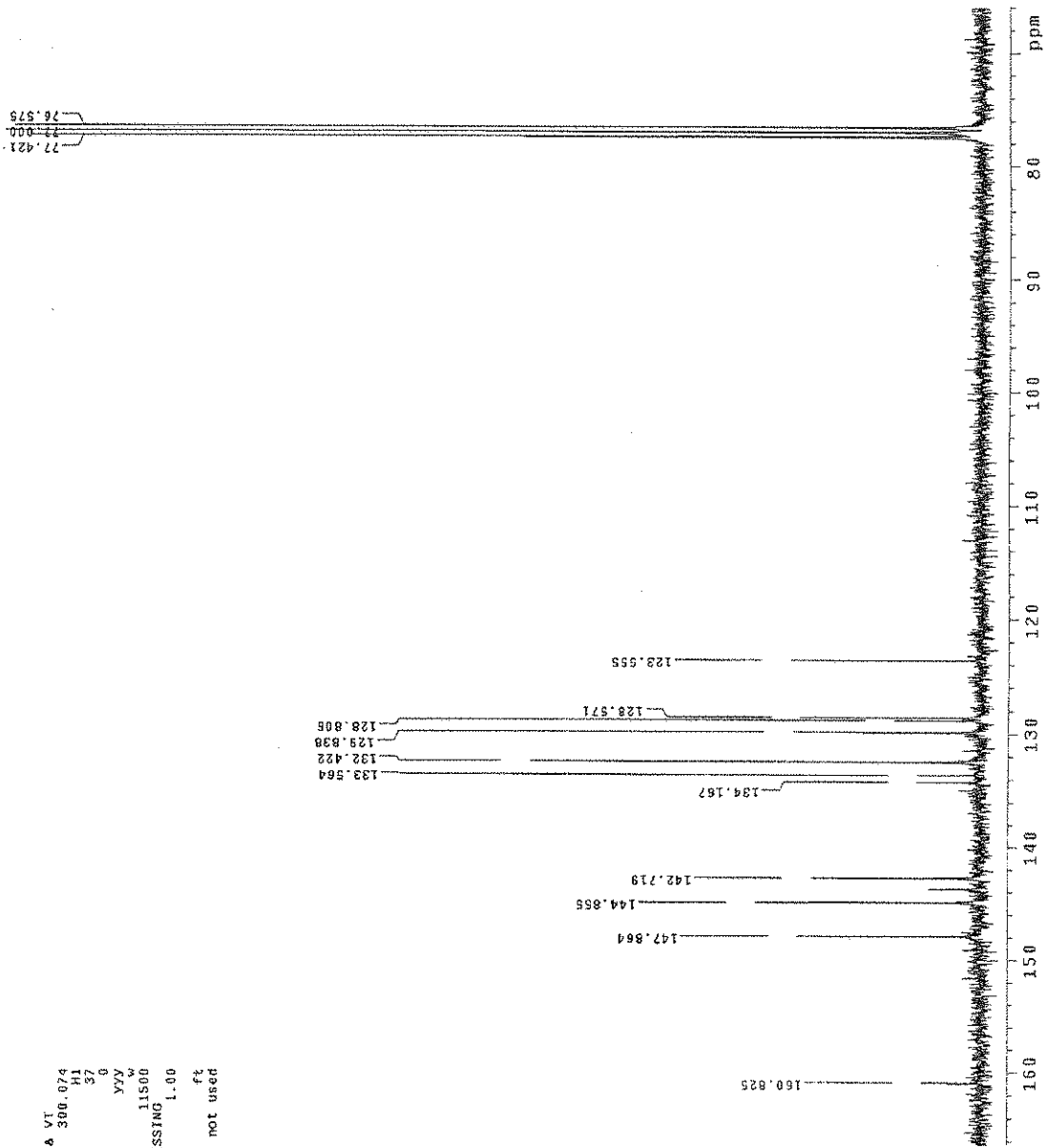
IČ spektrum: 3377 (NH), 1685 (CO).



```

MD316-II
exp6 st013c
SAMPLE
date Dec 16 2003 dfrc DEC. 8 VT
gate CDC13 dn HI
solvent CDCl3 dn 37
file /export/home/~dpwr vimri/00leza1/MD316-00f 0
8-ii.C.fid dm YVY
ACQUISITION dmm w
sfrq 75.061 dmf l1500
tr 1 C13
nt 1.500 lb
nu 68306 stfile
sv 18781.7 gproc ft
fb 10400 fn not used
bs 16
tdwr 50 weff
pw 16.2 wexp
d1 5.000 wbs
tof 0 wnt
rt 1024
clock 344
gain not used
FLAGS n
ii n
in n
dp DISPLAY y
sp 4977.4
wp 7566.5
sc 17.0
cc 200
bzmm 37.84
ls 500.00
rfl 7637.0
ffp 5803.9
th 10
fms no ph 100.000

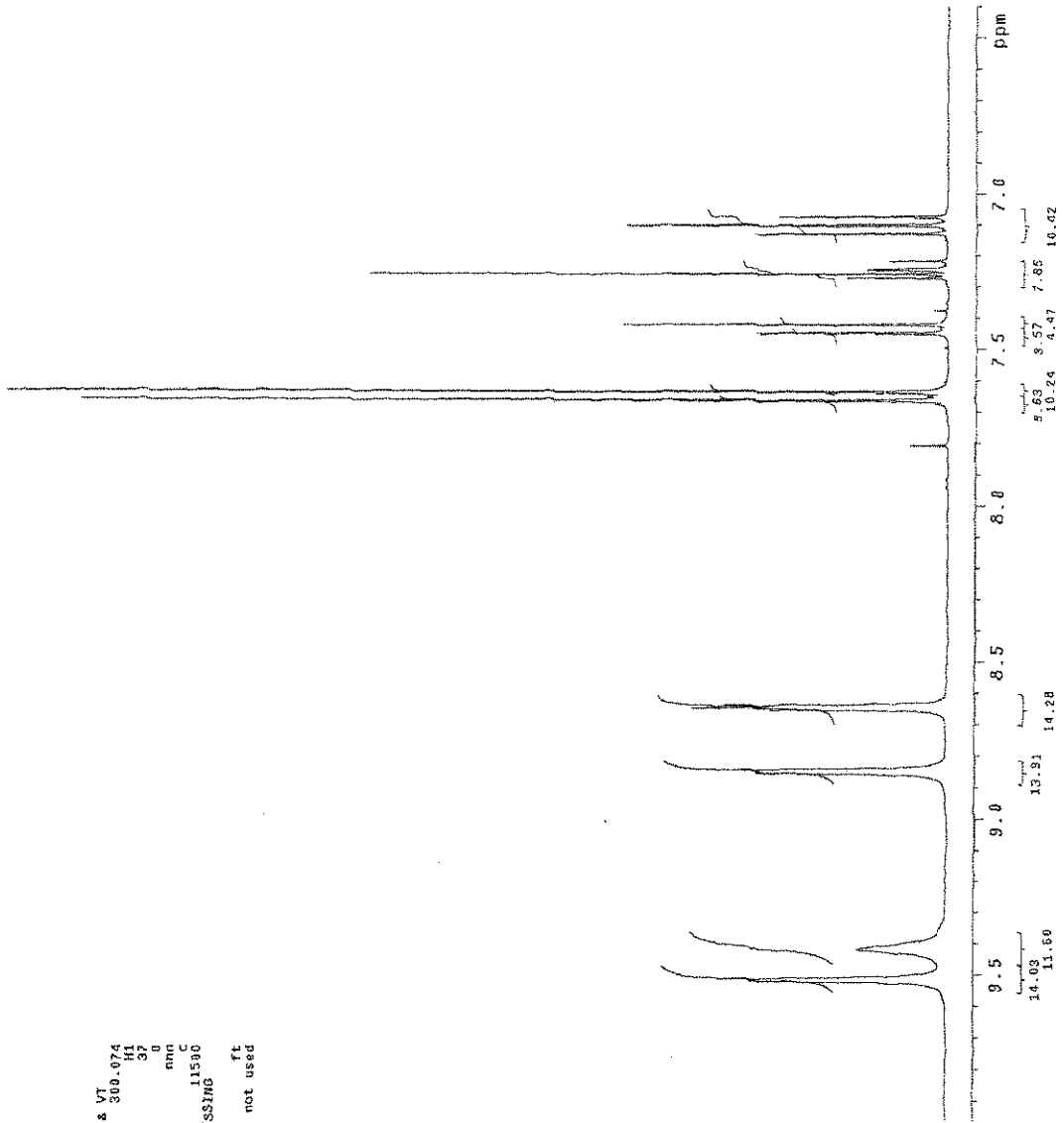
```



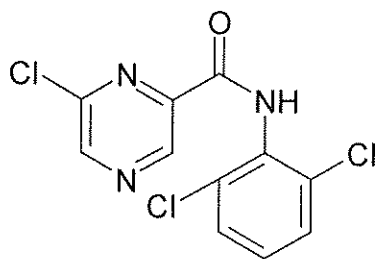
```

WD316-II
exp5 stdih
SAMPLE
date Dec 16 2003 DEE. & VT
solvent CDC13 dfrq 300.074
file /export/home/~dpcw 37
vnmr1/001ezai/0031- dof 0
srinr/111 dm nmc
ACQUISITION 388.074 dar 11500 C
sfreq 388.074 dar PROCESSING
tn at 1.338 wtfile
np 17364 proc not used
sw 4500.5 fn
bs 28.00
ts 10 werr
tpr 54 wexp
pv 7.0 wbs
dl 5.000 wnt
lor 0
rt 16
ct 16
stock 0
gain not used
ii FLAGS n
in n
dp y
DISPLAY
sp 1920.0
wp 1070.2
vs 170
sc 200
kzamm 500
fs 800.00
rfp 2884.1
th 2178.5
lms 100.000
nm cdc ph

```



### 3.4.7. (2,6-dichlorofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Tabulka č. 12.

Vzhled	světle béžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	302,55			
Sumární vzorec	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>3</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	330 mg (78,0 %)			
Teplota tání	178 – 181 °C			
R <sub>F</sub>	0,77			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	43,67 %	5,29 %	13,89 %	2,00 %
Nalezeno	43,51 %	-	14,11 %	1,78 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,41 (bs, 1H, NH), 9,38 (s, 1H, H3), 8,83 (s, 1H, H5), 7,12-7,52 (m, 3H, H3', H4', H5').

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,3, 147,8, 147,4, 143,2, 142,1, 136,1, 132,9, 130,7, 130,6, 128,3 a 121,5.

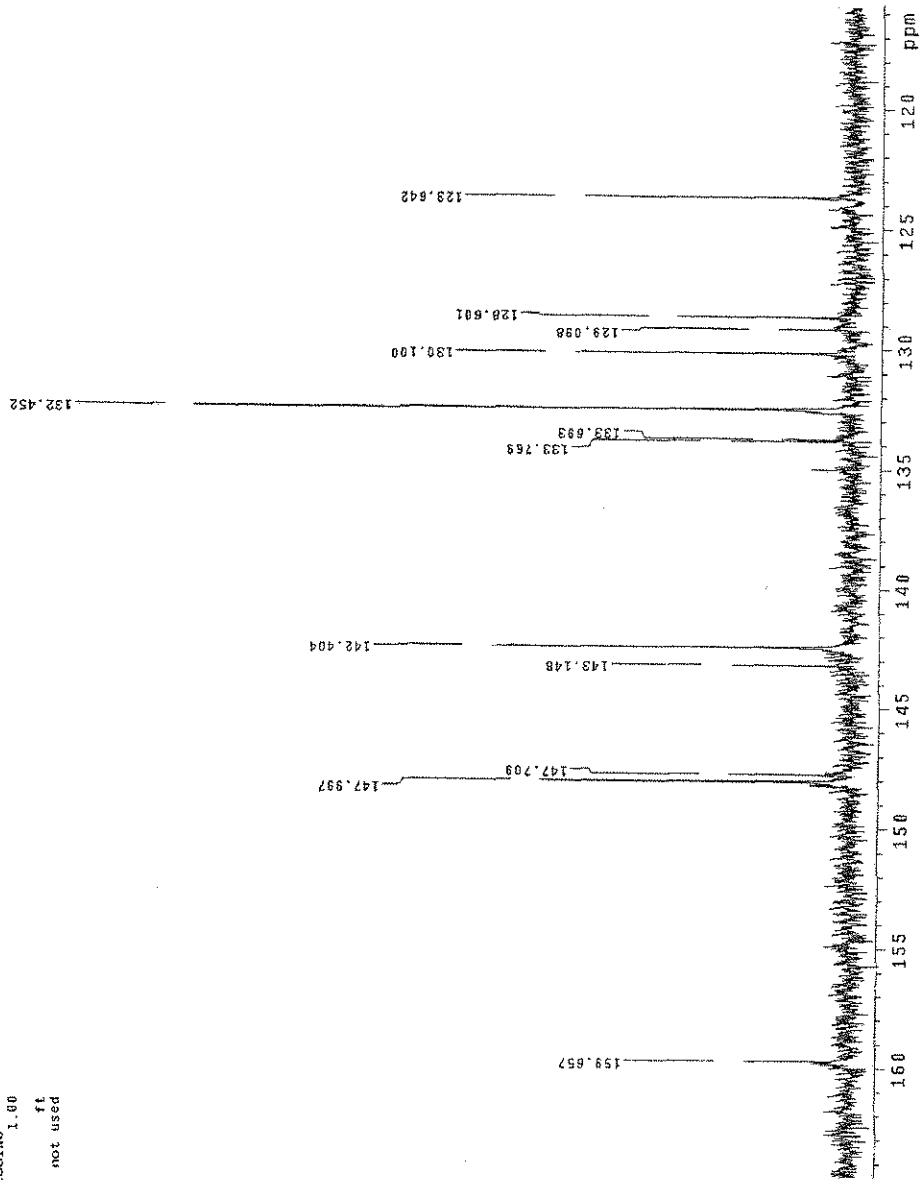
IČ spektrum: 3370 (NH), 1690 (CO).



MD317-II

exp8 stu13c

```
SAMPLE      DEC. & VT
date       16. 2003   dfrq      300.074
solvent    cdc13
file       /export/home/~dowr
vmrfl/d01ezsl/MS1~ 80f      0
7-ii_C.fid dm          yyy      v
ACQUISITION dmm          11500
sfrq       75.481      dmf
in         C13
pc         4.885      lb
sw         18761.7    wfile
fb         10400      proc
bs         16        fn
tpwr       50        werr
pw         16.2      wexp
di         5.000     wbs
tof        0        wnt
nt         1024
rt         22
clock      not used
gain
flags      not used
ii         n
in         n
dp         y
SP         8722.8
W1         3652.8
W2         209
SC         0
WC         200
hZmm      18.45
is         500.00
rfi       7636.7
t1p       5089.3
t2p
t3p
lms       100.000
nm no     pp
```

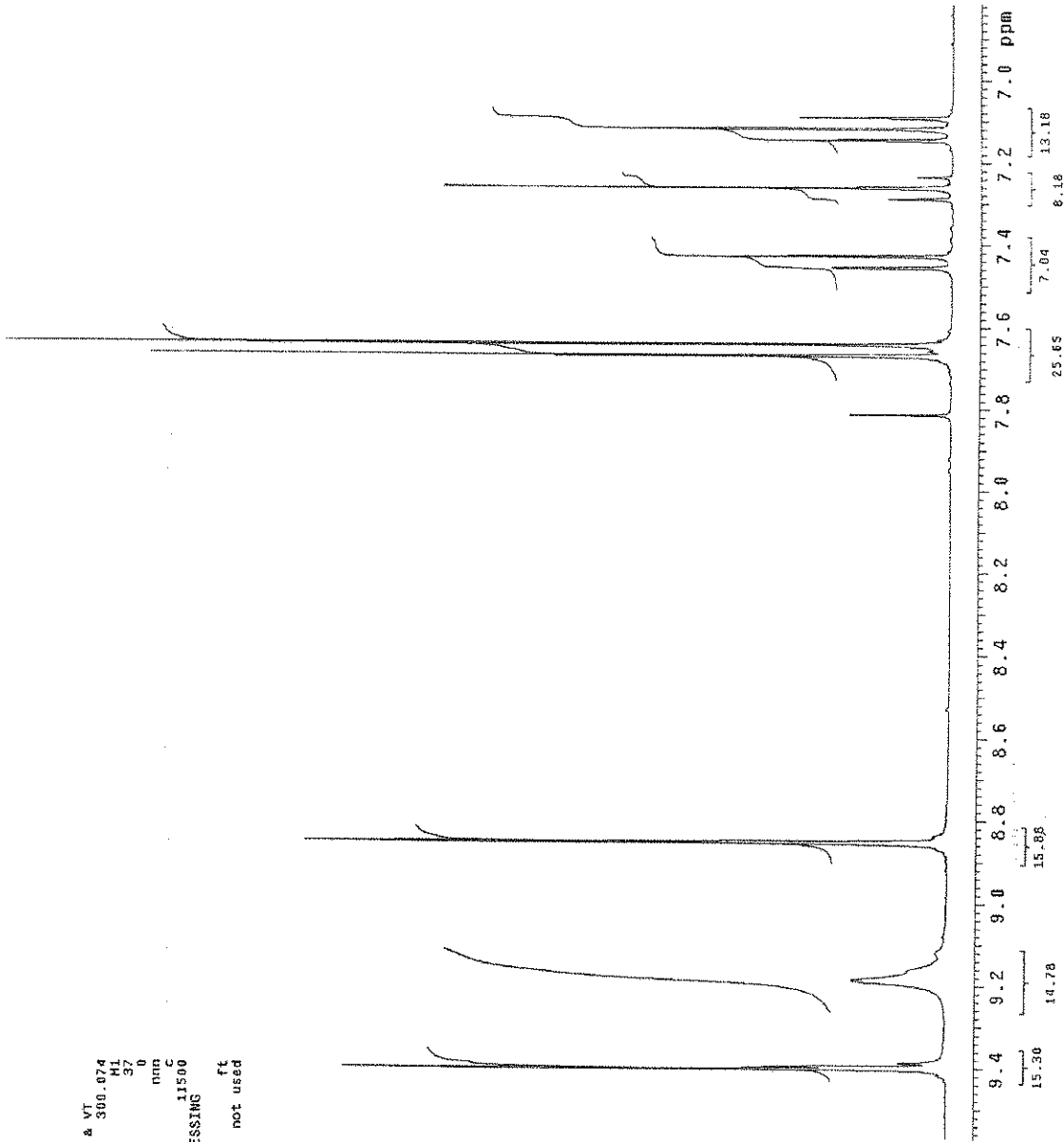




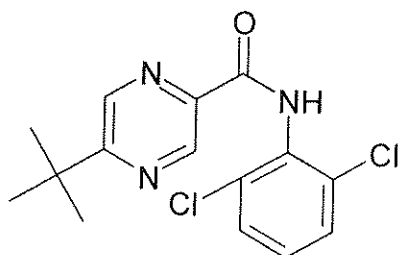
```

MDS17-II
exp5 stidh
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 16 2003 gfrq DEC. & VT
solvent CDC13 dn
file /export/home/~ dpwf 37
vmr1/001ezal/m03i~ dof 0
r11 R-fid sm nmm
ACQUISITION 300.074 smf C
sfrq 300.074 smf 11500
IN 1.998 H1
at 1.998 wfile
np 17964 proc
sw 4500.5 fn not used
fb 2600
bs 16 werr
tpwr 54 wexp
pw 7.8 wbs
tof 5.000 wnt
nt 16
ct 16
alock n
gain not used
flags
ii n
in n
dp n
SP DISPLAY 2044.2
wp 827.7
v5 170
sc 0
wc 200
hzmm 4.14
is 2255.72
rfi 2688.1
tpp 2176.5
ms 100.000
na cdc ph

```



3.4.8. (2,6-dichlorofenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



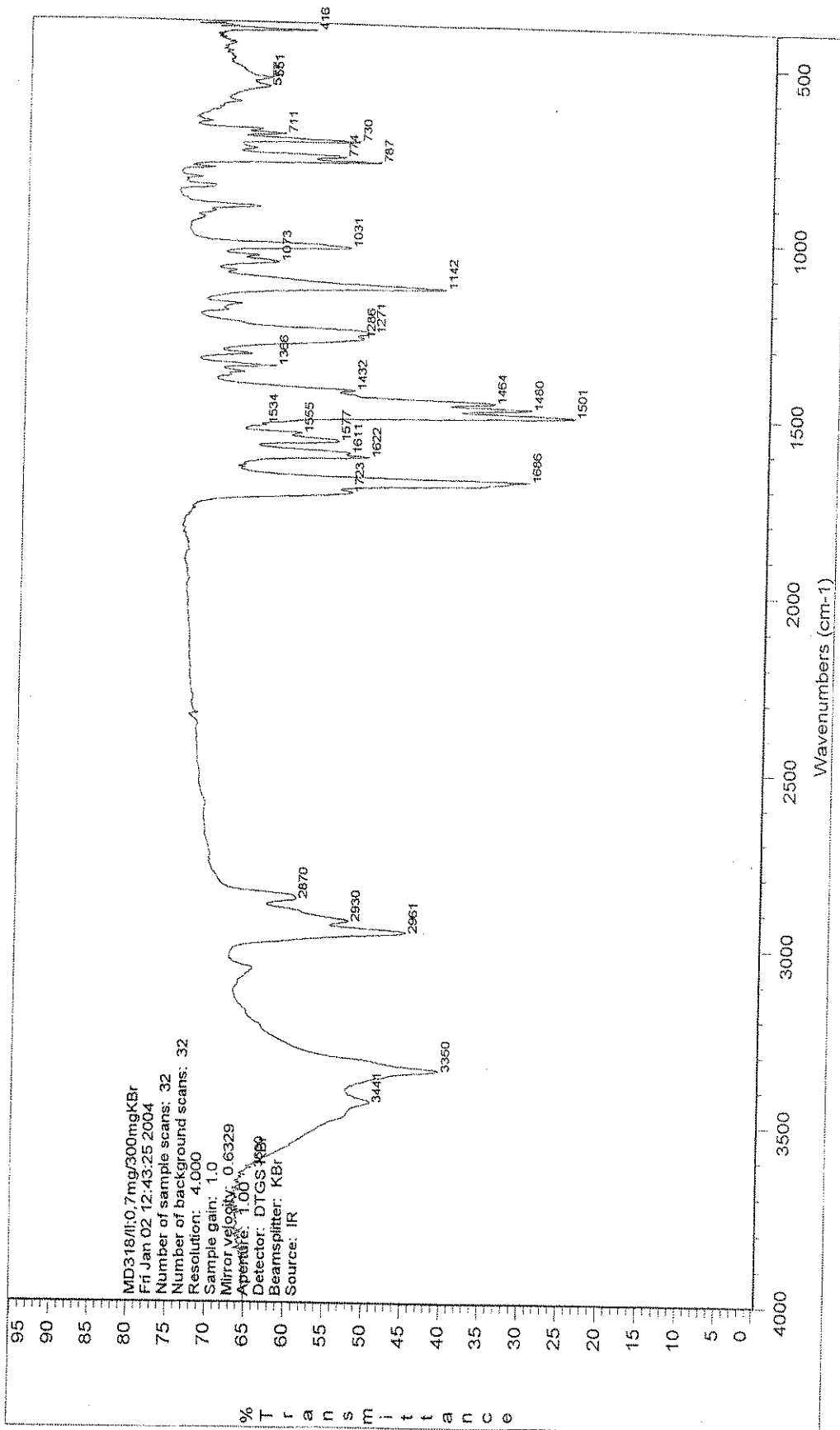
Tabulka č. 13.

Vzhled	bílá krystalická látka			
Molekulová hmotnost	324,21			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>2</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	193 mg (42,5 %)			
Teplota tání	53 – 55 °C			
R <sub>F</sub>	0,87			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	55,57 %	4,93 %	12,96 %	4,66 %
Nalezeno	55,63 %	-	13,08 %	4,71 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,67 (bs, 1H, NH), 9,37 (d, 1H, *J* = 1.37 Hz, H3), 8,61 (d, 1H, *J* = 1.37 Hz, H6), 7,12-7,48 (m, 3H, H3', H4', H5') a 1,45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168,2, 161,2, 143,2, 143,0, 142,1, 140,7, 139,0, 136,9, 133,0, 130,6, 127,7, 121,3, 118,9, 37,1 a 29,7.

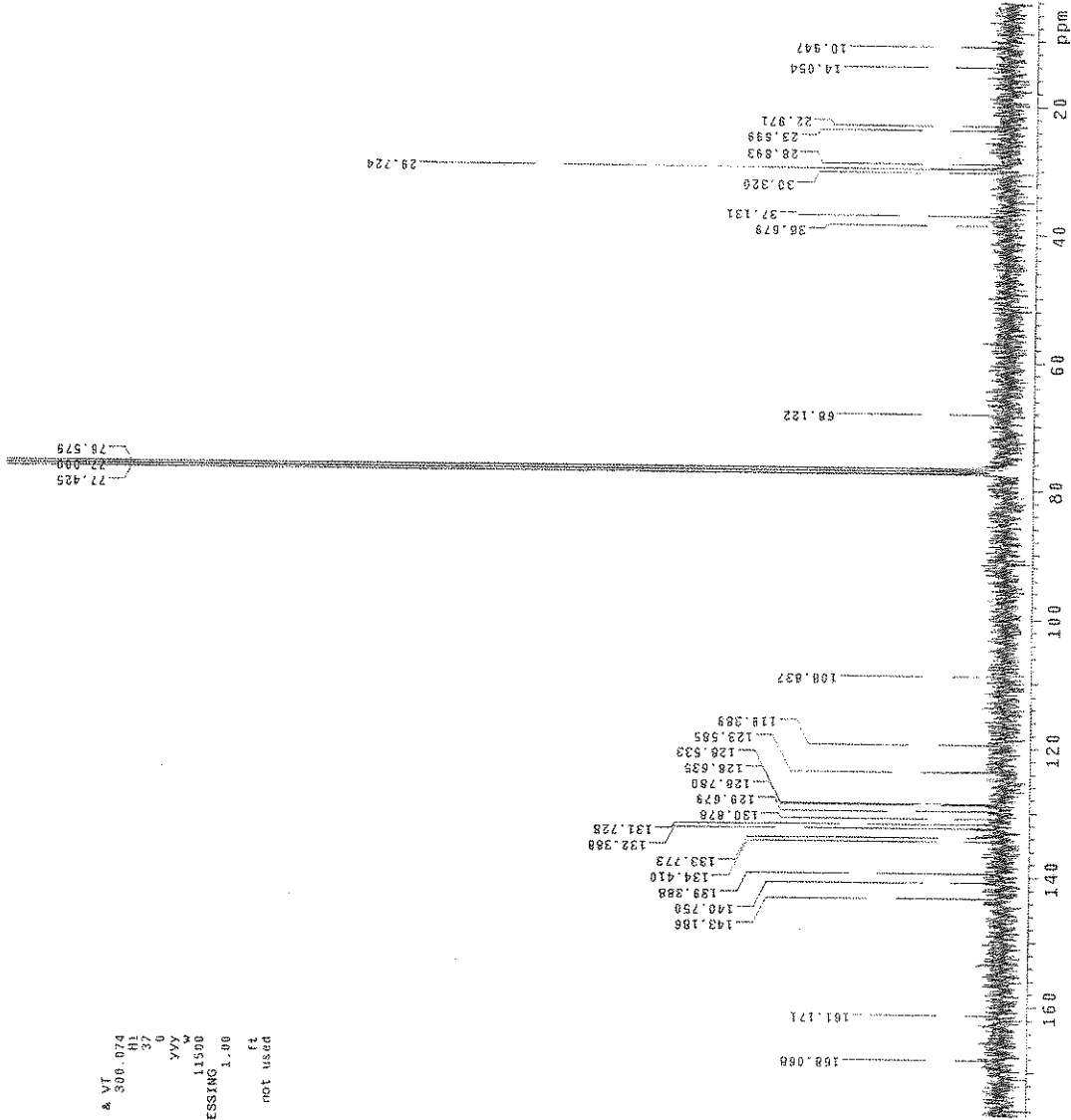
IČ spektrum: 3365 (NH), 1685 (CO).



15C OBSERVE

exp5 st012c

SAMPLED DEC. & VI  
date Dec 15 2003 dfrq 300.074  
time 08:27 dn 0  
file/export/MSI~ dof 5  
vmaxf/DoIzal/MSI~ dof 5  
8-II.C.fid dm vvy  
ACQUISITION  
sfrq 75.461 dmf 11500  
at 1.413 lb PROCESSING  
np 68106 wfile 1.00  
sv 10781.7 proc f1  
fb 10400 fh not used  
bs 18  
lpwr 50 werr  
dw 162.088  
dly 5.000 wdr  
tof 0 wtk  
nt 1024  
ct 224  
a lock  
gain not used  
fl flags  
ii n  
in n  
in n  
dp DISPLAY y  
sp 735.8  
wp 13040.8  
vs 267  
sc 0  
vc 208  
Rzmm 85.20  
fzmm 7656.00  
fz1 5889.9  
fz2 5889.9  
fh 6  
ins 100.000  
nm no ph



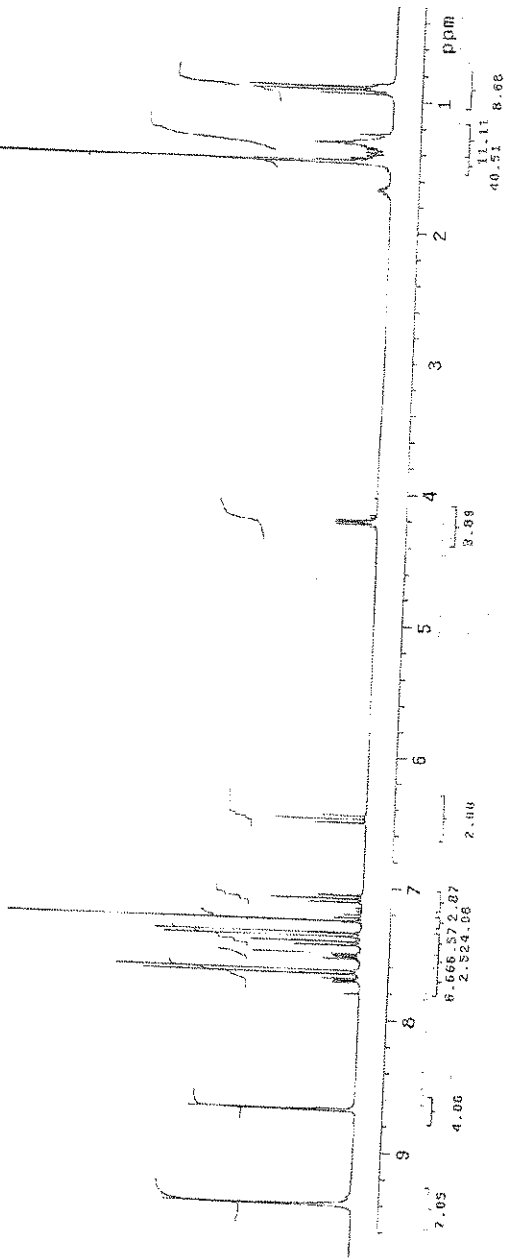
MD318-11

exp6 std1h

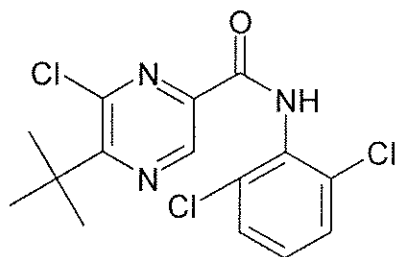
```

SAMPLE          DEC A VT
date            2003 dfrq    300.074
rec            17883 dn
solvent        /export/bois h1
file           /export/bois 37
vname         /export/MD318-11
R-ff          R-ff_h_fid 0
nm            nm
ACQUISITION    dnm
tr           300.074 def 11500
at           1.498
np           17883 wf file
sw           4500.5 frc
fb           2800
cp           16 werr
tdwt        54 wexp
pv           70 whs
rl           5.000 B
tof
nt           16
clock        16
grin         not used
ii          ii
id           h
dp           y
SP          80.6
WD          2856.4
VS          404
SC          0
WC          200
lszmm      54.23
rff         2884.15
ffp         2178.5
th          20
ins         100.000
nm          cdc ph

```



### 3.4.9. (2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2- karboxylové kyseliny



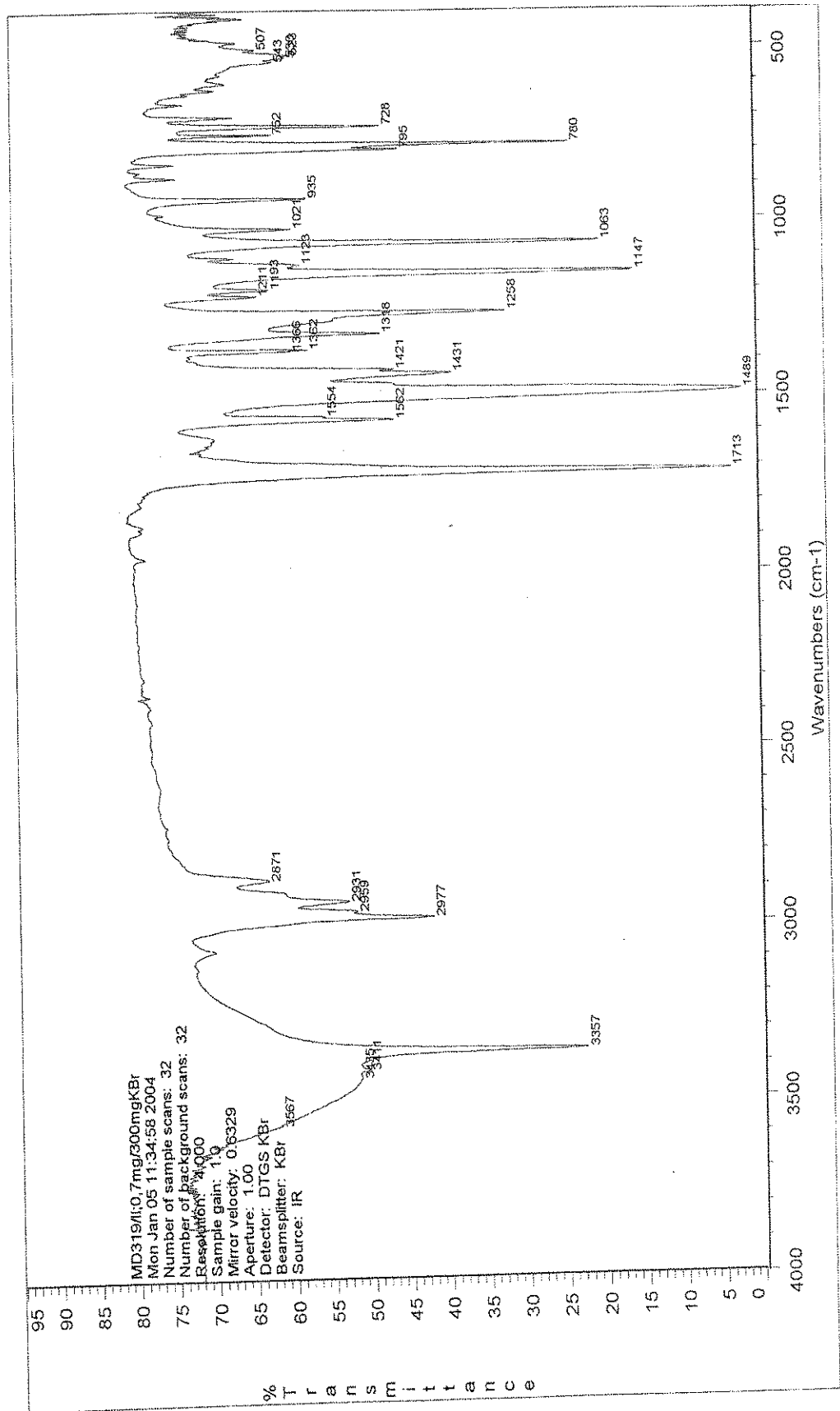
Tabulka č. 14.

Vzhled	běžová krystalická látka			
Molekulová hmotnost	358,66			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>3</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	385 mg (76,7 %)			
Teplota tání	130 – 131 °C			
R <sub>F</sub>	0,91			
Elementární analýza	<b>C</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>H</b>
Vypočteno	50,23 %	4,46 %	11,72 %	3,93 %
Nalezeno	<b>50,63 %</b>	-	<b>12,08 %</b>	<b>3,71%</b>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,38 (bs, 1H, NH), 9,25 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 7,12-7,48 (m, 3H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>) a 1,55 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165,1, 159,9, 145,8, 143,2, 142,1, 140,5, 140,3, 136,5, 133,0, 130,7, 128,2, 121,6, 119,1, 39,1 a 28,2.

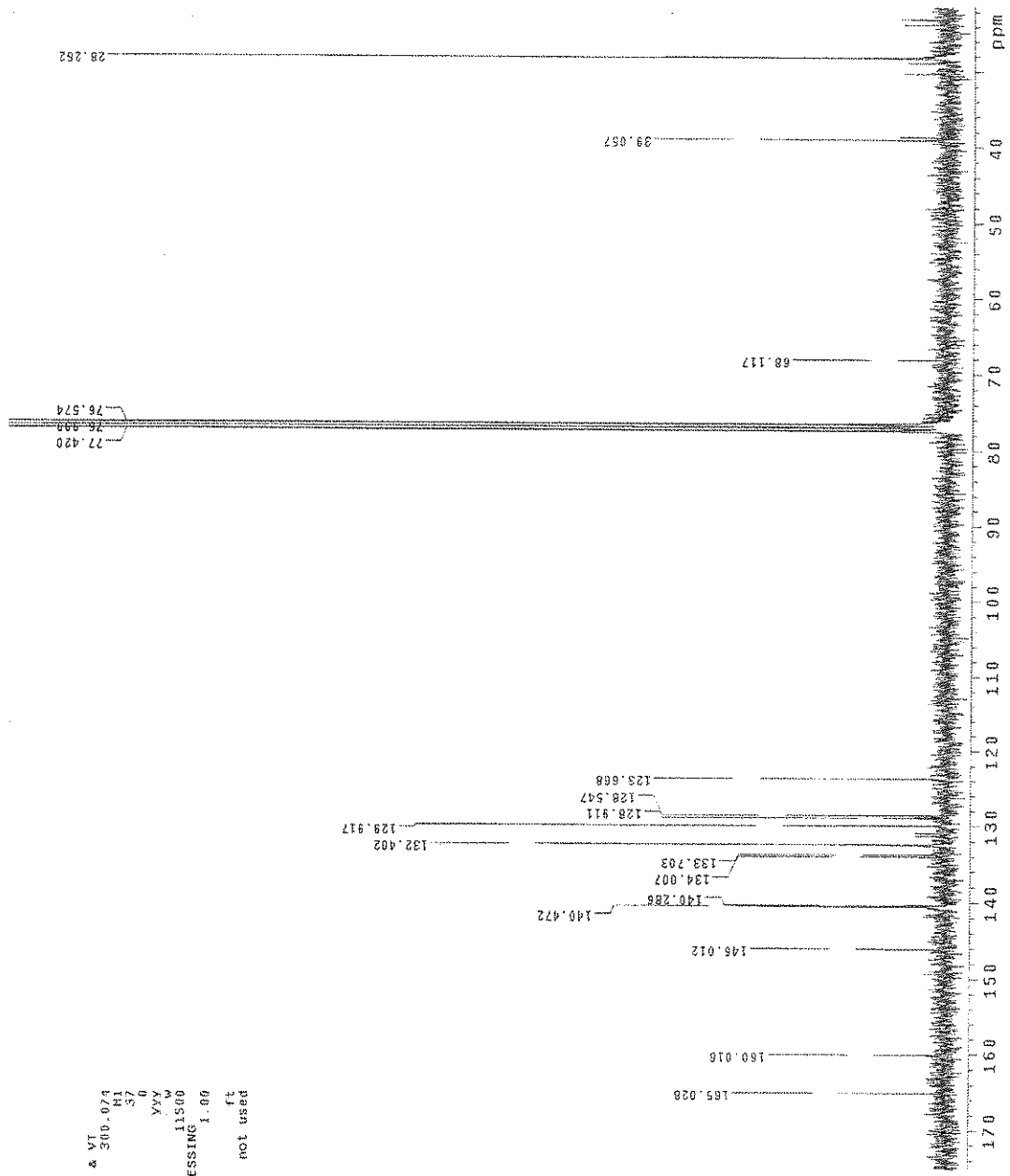
IČ spektrum: 3390 (NH), 1685 (CO).



```

#D513-11
exp6 54013C
SAMPLE DEC. & VI
date Dec 16 2003 dfrq 300.074
solvent C6Cl6 dn H1
file1/Bsect/MS7- dpr 37
vnmr1/Bsect/MS7- dpr 37
g-ll-c.fid dm Yxy 0
ACQUISITION dmr w
sfreq 75.461 dmf 11500
in C13
at 1.015 lb PROCESSING
sw 4305 file 1.00
ss 187517 proc ft
fb 10000 fn not used
bs 16
tpwr 16.50 werr
pw 16.2 wexp
pr 5.000 wds
tof 0.000
nt 1020 wnt
ct 337
alock
gain not used
flags
ii n
in n
ip n
DISPLAY Y
sp 1600.0
ve 1161.250
vc 250
sc 8
wc 200
hzmhz 58.06
ls 500.00
rfi 586.7
cfl 586.7
th 100.000
ins 100.000
nm no ph

```

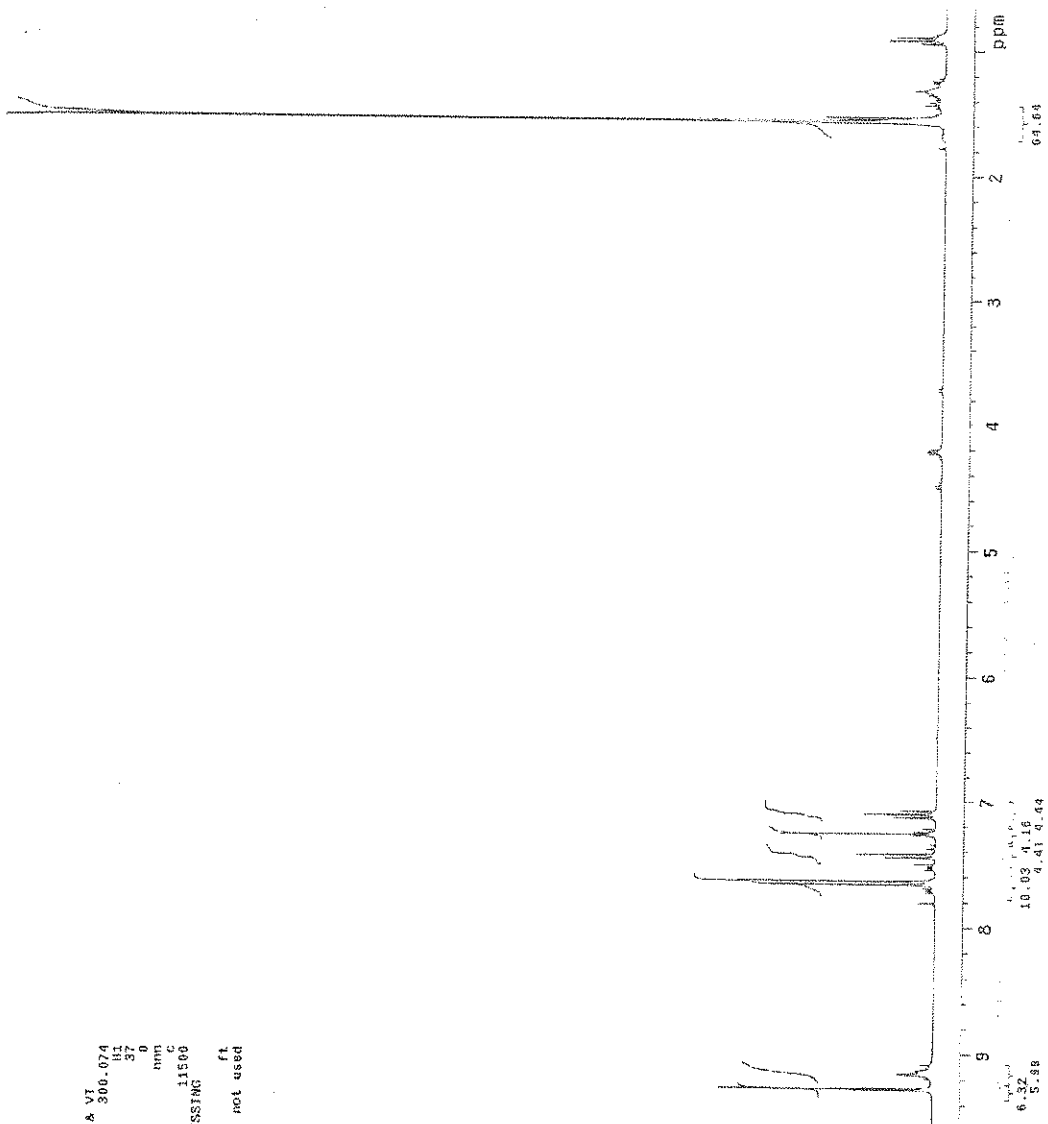




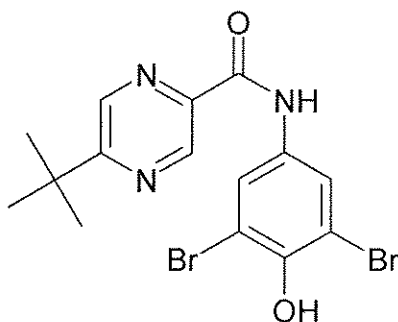
```

MD010-F1
  exps stadh
SAMPLE
  date Dec 10 2003 08:14 DEC. A VI
  file /export/rods/9-II-N.fid 300.074
  vname/DOEXAL/PDS1-001 30
  9-II-N.fid dm am C
ACQUISITION
  srfreq 300.074 dma 11500
  nt 16 wf file
  at 1.901 wf file
  op 17884 orac ft
  sw 4500.5 fh not used
  fd 2500
  bs 16 weff
  tprf 54 wexp
  di 5.000 wbs
  tof 0 wnt
  nt 16
  ct 16
  block n
  gain not used n
  ll flags n
  in n
  dp y
  display 1
  sp 133.2
  wp 266350
  vs 2500
  sc 200
  wc 200
  szmm 13.42
  rfl 800.00
  rfp 2178.15
  th 20
  nus 100.000
  nm cdc ph

```



3.4.10. (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-  
karboxylové kyseliny



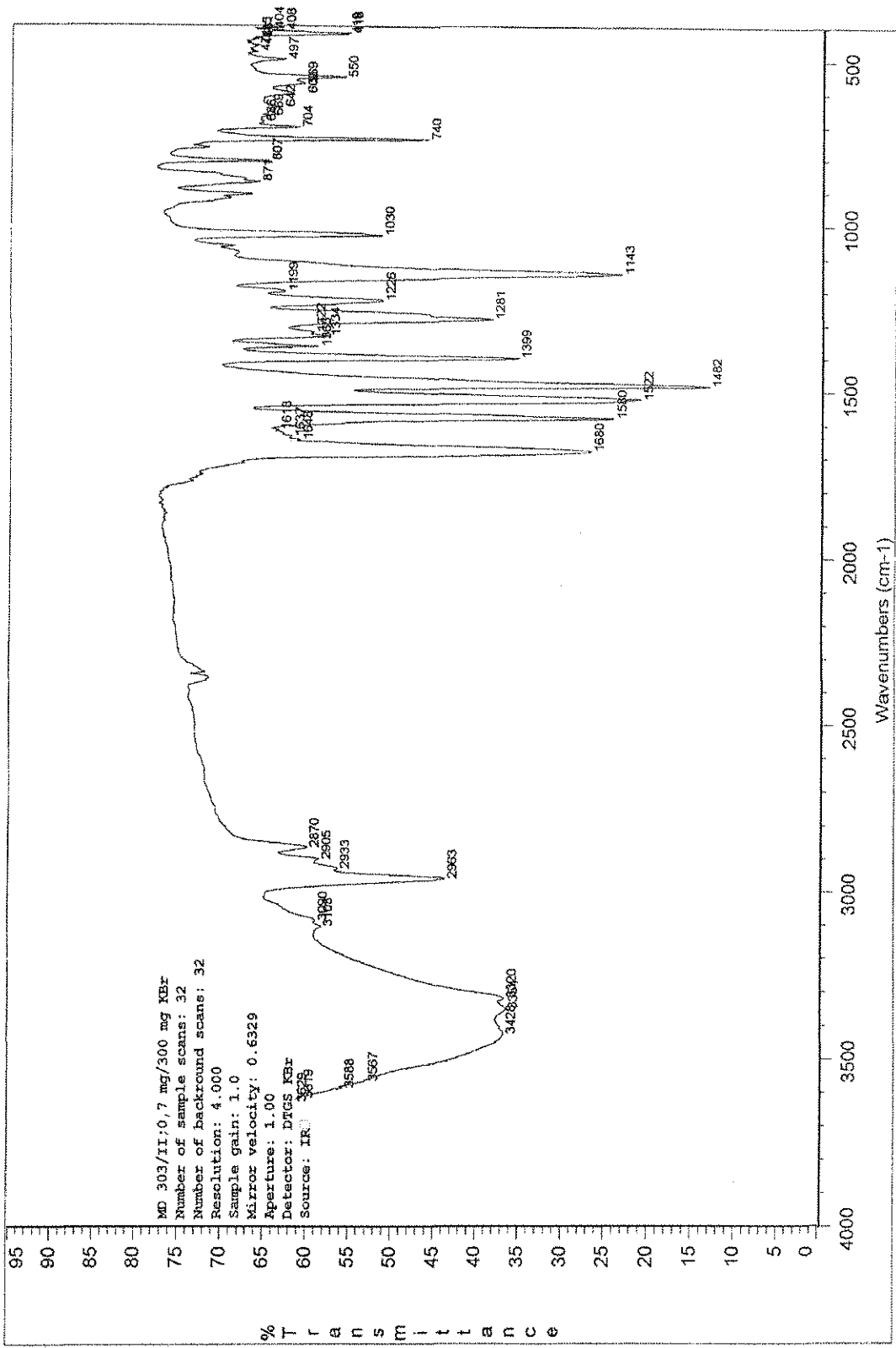
Tabulka č. 15.

Vzhled	světle hnědá krystalická látka			
Molekulová hmotnost	429,11			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>			
Výtěžek (výtěžnost)	500 mg (83,2 %)			
Teplota tání	109 – 111 °C			
R <sub>F</sub>	0,90			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	41,99 %	7,46 %	9,79 %	3,52 %
Nalezeno	42,11 %	-	9,68 %	3,85 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.55 (bs, 1H, NH), 9.36 (d, 1H, J=1.38 Hz, H3), 8.60 (d, 1H, J=1.37 Hz, H6), 7.95 (s, 2H, H2', H6'), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.1, 161.0, 146.5, 142.9, 140.8, 139.1, 131.8, 123.4, 109.7, 37.1, 29.7.

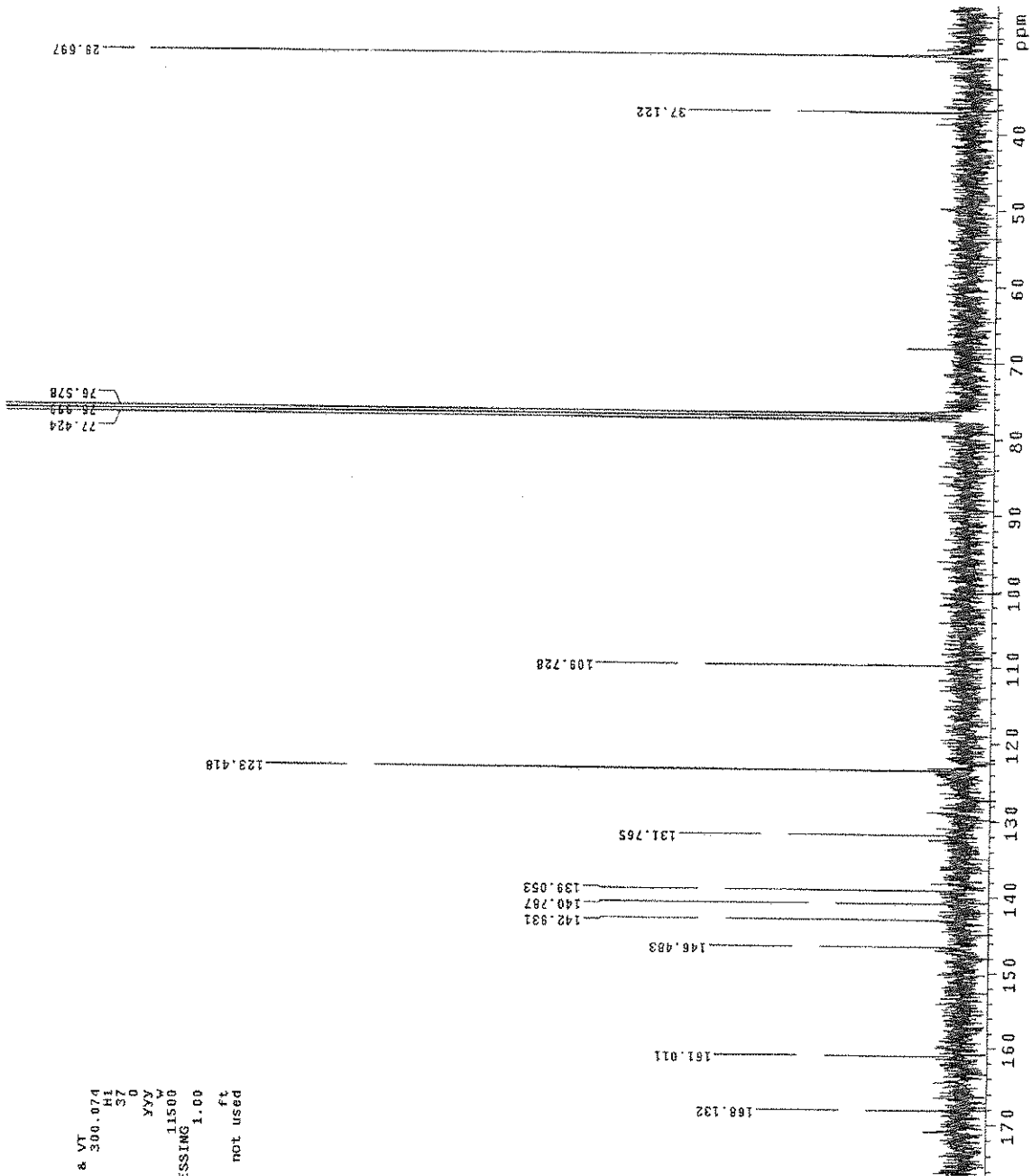
IČ spektrum: 3351 (NH), 1680 (CO).



```

MD303-II
exp6 std13c
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 16 2003 dfrq 300.074
solvent CHCl3 dn 41
file /export/home/~ dpwr 37
vmr1/bolezal/ND30- dof 0
3-II_C.fid dm yyv
ACQUISITION dmf 11500 W
sfrq 75.461
in 1 C13 PROCESSING
nt 58213 lb 1.00
nw 187817 vfile
fb 10400 fn not used
bs 16
tpwr 50 werr
pw 16.2 wexp
dl 5.000 wbs
tof 0 wnt
nt 1024
nt 193
GLOCK
gain not used
FLAG
il n
in n
dp n
DISPLAY y
sp 1748.0
wp 11562.5
xc 250
wc 200
hzmm 57.81
fs 500.00
rf1 7636.4
rff 5809.9
th 16
ins 100.000
nm no ph

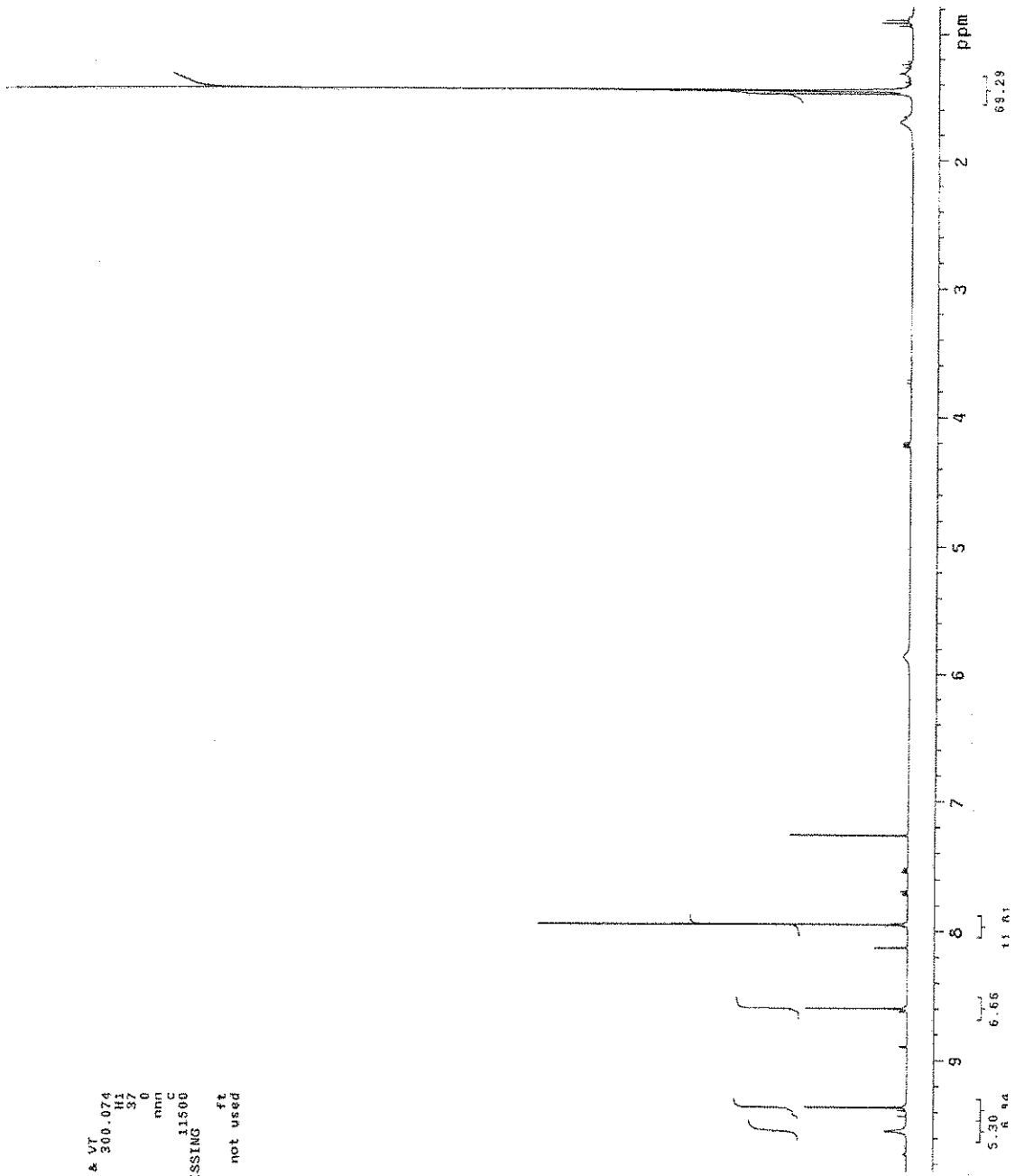
```



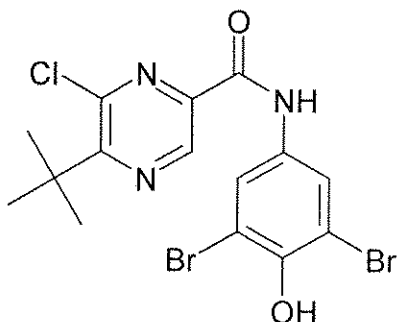
```

MD303-II
exp5 stdlh
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 18 2003 dfrq 300.074
solvent C8Cl3 dn H1
file /export/home/~dpar 37
vnmr1/00322/00322.dcf 0
nmr1/00322/00322.fid dm nnn
ACQUISITION dm 11500
sfrq 300.074 dmf PROCESSING
tn H1
at 1.988 wfile
np 17884 proc ft
sw 4500.5 fn not used
fb 2600
ds 16 wefr
cpwr 54 wexp
dv 70 wds
d1 5.000 wnt
tof 0
nt 16
ct 16
alock n
gain not used
flags n
il n
in n
op y
DISPLAY 234.6
wp 2726.1
vs 300
sc 0
wc 200
hzmm 13.83
fs 780.00
f1 2884.2
f2 2176.0
ins 100.000
nm cdc ph

```



3.4.11. (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



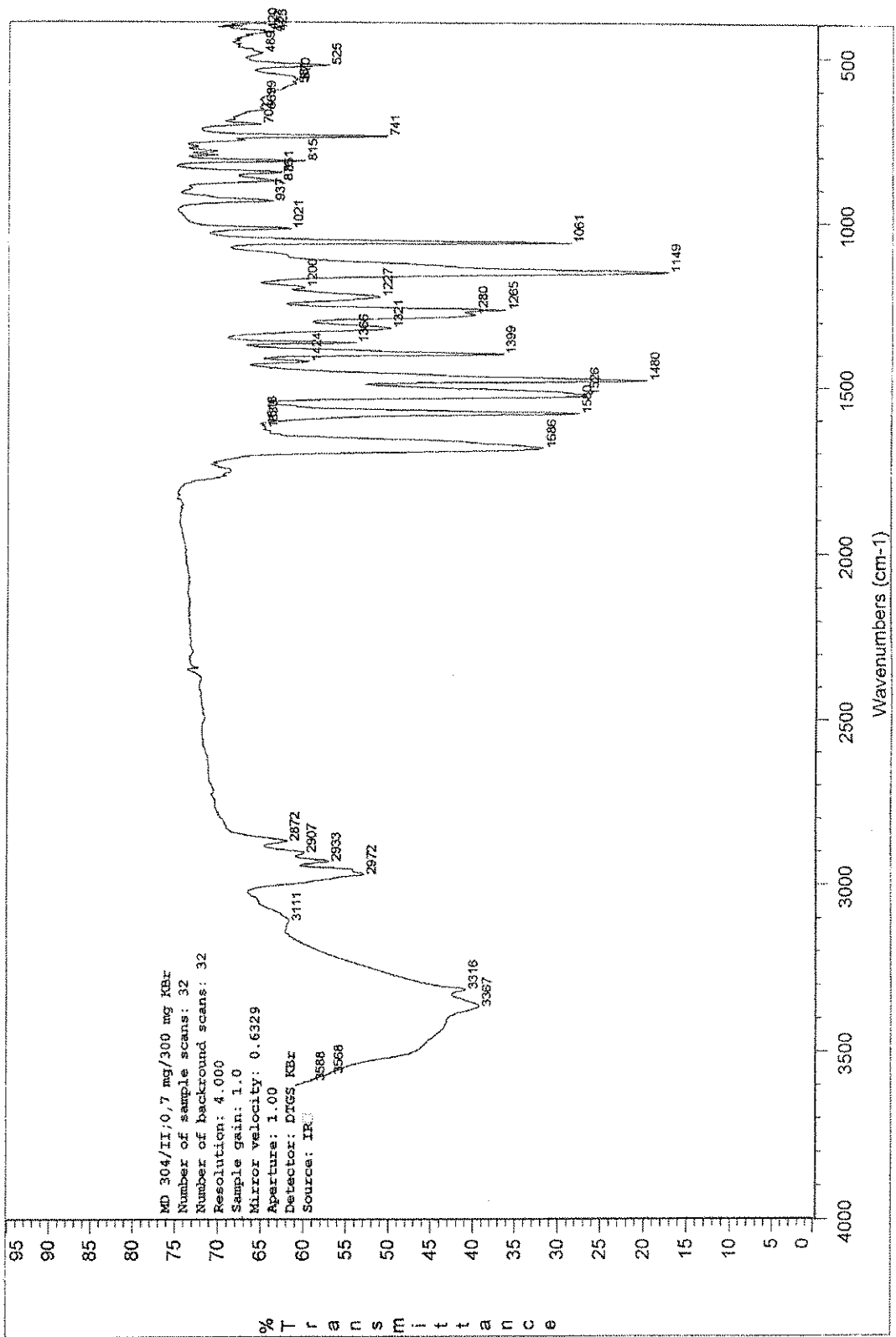
Tabulka č. 16.

Vzhled	světle hnědá krystalická látka			
Molekulová hmotnost	463,56			
Sumární vzorec	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> Cl			
Výtěžek (výtěžnost)	345 mg (53,2 %)			
Teplota tání	182 – 185 °C			
R <sub>F</sub>	0,93			
Elementární analýza	C	O	N	H
Vypočteno	38,87 %	6,90 %	9,06 %	3,04 %
Nalezeno	39,18 %	-	9,12 %	3,34 %

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.31 (bs, 1H, NH), 9.24 (d, 1H, J=0.55 Hz, H3), 8.03 (s, 2H, H2', H6'), 5.71 (s, 1H, OH), 1.49 (s, 9, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161.2, 159.0, 147.8, 144.8, 142.7, 139.8, 132.2, 124.7, 112.1, 31.7, 29.7.

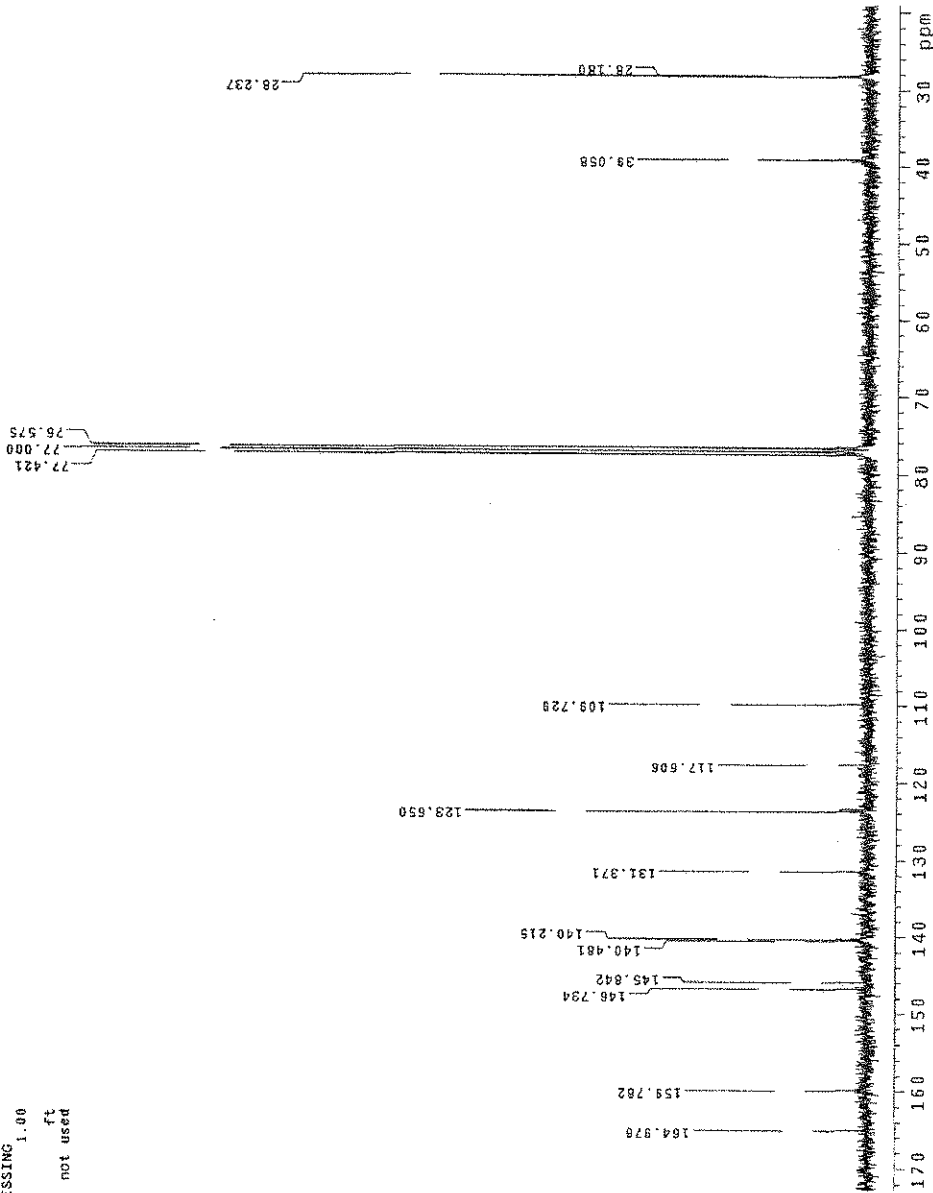
IČ spektrum: 3432 (NH), 1685 (CO).



```

MD-30a-II
exp6 std13c
SAMPLE
date Dec 16 2003 dfrq DEC. 8 VT 300.074
solvent CDCl3 dn HI
file /export/home/~dswf 37
vnmr1/Dolezal/MD-3-dot
04-II_C.fid dm yyy
ACQUISITION
sfrq 75.061 dmf 11500 w
sr 1.313 lb 1.000 PROCESSING 1.00
no 68100 wffile
sw 18761.7 proc ft
fb 10000 fn not used
rs 16
tpwr 50 warr
pw 16.2 waxp
di 5.000 was
tcf 0 wnt
nr 1024
sc 192
clock
gain not used
SIN FLAGS
i1 n
in n
ip y
SP DISPLAY
sp 1483.7
wp 11535.1
sc 108
cc 8
wc 200
h2mm 57.88
is 500.00
rf1 7636.4
tff 5886.4
ch 5
ins 100.000
mr no ph

```

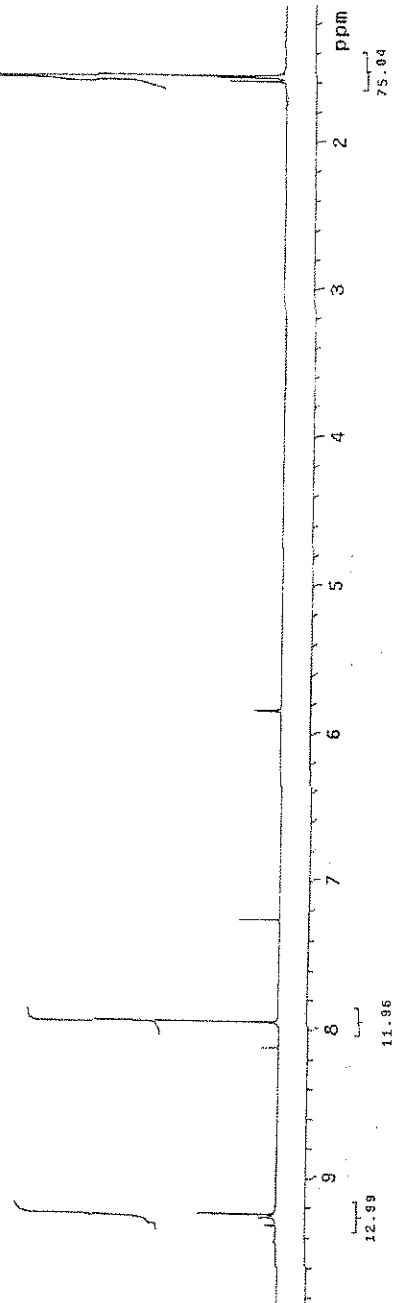




STANDARD 1H OBSERVE

```

exp5 stdzh
SAMPLE DEC. & VT
date Dec 15 2003 dfrq 300.074
solvent CDCl3 dn HI
f1/b exp 37 dpwr 0
ACQUISITION exp nmq
sfrq 300.074 dm nmq
in HI dnm
ex 17382 dnr 11500
nd 4500.5 wft 16
sw 2600 pproc ft
fb 16 fn not used
hs 54
tpwr 7.0 werr
pw 5.000 wekp
dl 0 wbs
dt 18 wnt
ct 16
elock not used
gain not used
FLAGS
f1 n
in n
dp y
DISPLAY 217.4
vs 2037.4
sc 88
wc 200
hzmm 13.19
fs 500.00
rf1 2884.1
vfp 2178.5
vrg 0.00
irg 100.000
nm cdc ph
  
```



## 4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

### 4.1. Antifungální aktivita

Připravené deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na antifungální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové Doc. RNDr. Vladimírem Buchtou, CSc. se spolupracovníky.

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufovaný na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (Sigma). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975  $\mu\text{M}$ . 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 72 a 120 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/I, *Trichosporon asahii* 1188, *Trichophyton mentagrophytes* 445, *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272.

Přehled testovaných látek je uveden níže (tabulka č. 17).

#### Testované kmeny

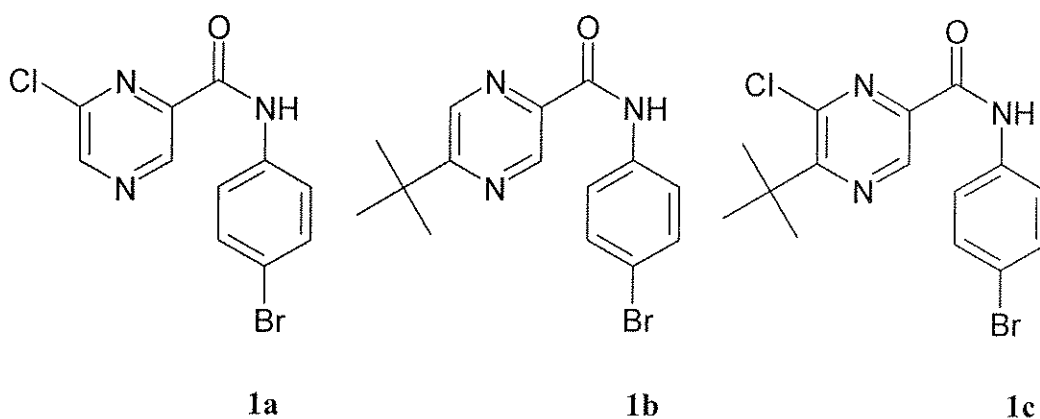
- |   |   |
|---|---|
| 1. CA- <i>Candida albicans</i> ATCC 44859 | 5. TA- <i>Trichosporon asahii</i> 1188        |
| 2. CT- <i>Candida tropicalis</i> 156      | 6. TM- <i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 |
| 3. CK- <i>Candida krusei</i> E28          | 7. AF- <i>Aspergillus fumigatus</i> 231       |
| 4. CG- <i>Candida glabrata</i> 20/I       | 8. AC- <i>Absidia corymbifera</i> 272         |

Tabulka č. 17: Antifungální aktivita.

Slouč.	MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )							
	TM	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC
	72h 120h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h
1	>125	>125	>125	>125	>125	>125	<b>62,5</b>	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
2	<b>500</b>	<b>250</b>	500	<b>500</b>	>500	<b>500</b>	<b>250</b>	>500
	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3	>500	<b>62,5</b>	<b>500</b>	<b>250</b>	>500	<b>125</b>	<b>125</b>	<b>250</b>
	<b>125</b>	<b>125</b>	>500	>500	>500	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
4	>250	<b>250</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
5	>250	<b>250</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
6	<b>250</b>	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
7	<b>125</b>	<b>125</b>	>500	<b>500</b>	>500	>500	>500	>500
	<b>125</b>	<b>250</b>	>500	>500	>500	>500	>500	>500
8	<b>125</b>	<b>62,5</b>	>250	>250	>250	>250	>250	<b>250</b>
	<b>125</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
9	>250	<b>125</b>	>250	>250	>250	>250	>250	<b>250</b>
	>250	<b>125</b>	>250	>250	>250	>250	>250	<b>125</b>
10	<b>62,5</b>	<b>62,5</b>	>250	>250	>250	>250	<b>125</b>	<b>250</b>
	<b>62,5</b>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	<b>250</b>
11	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>125	>125	>125	>125	>125	<b>125</b>
	<b>125</b>	<b>31,25</b>	>125	>125	>125	>125	>125	<b>125</b>
KET	<b>0,98</b>	<b>&lt;0,24</b>	<b>1,95</b>	<b>0,98</b>	<b>0,49</b>	<b>&lt;0,24</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>
	<b>1,95</b>	<b>&lt;0,24</b>	<b>3,91</b>	<b>1,95</b>	<b>1,95</b>	<b>&lt;0,24</b>	<b>7,81</b>	<b>31,25</b>

Poznámky: **tučně** = hodnota MIC se nachází v rámci testovaného rozmezí koncentrací

V tabulce č. 18<sup>66</sup> jsou uvedeny antifungální aktivity látek syntetizovaných M. Doležalem a kol., jenž kompletuje sérii látky 1 (1a, 1b, 1c).



Tabulka č. 18.

Slouč.	MIC ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )							
	TM	CA	CT	CK	CG	TA	AF	AC
	72h 120h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h	24h 48h
1a	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
1b	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
1c	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125

## 4.2. Antimykobakteriální aktivita

Připravené látky jsou podrobeny testování na antituberkulotickou účinnost. Smlouva podepsaná 1996 mezi FaF UK v Hradci Králové a *Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)*, součást *National Institute of Health (NIH)*, nás zapojila do mezinárodního vyhledávacího programu nových antituberkulotik (*Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, TAACF*).

Primární *in vitro* skrínink látek je prováděn při koncentraci 12,5  $\mu\text{g/ml}$  (případně molární ekvivalent sloučeniny s nejvyšší molekulovou hmotností v sérii příbuzných látek) proti *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv v mediu *BACTEC 12 B* za použití radiometrického systému *BACTEC 460*. Látky, u kterých je v primárním skríninku nalezena vyšší než 90% inhibice, jsou zařazeny do další fáze testování při nižších koncentracích proti *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv za účelem určení skutečné MIC v mikrodilučním *Alamar Blue testu (MABA)*. Zároveň jsou látky zkoušeny proti *M. avium*. V případě zjištění dostatečné aktivity následuje testování cytotoxicity a dále experimenty na laboratorních zvířatech.

V následující tabulce je pro lepší pochopení vztahu struktury a antimykobakteriální aktivity uvedena též aktivita (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amidu 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny, jež doplňuje sérii látek 10 a 11 (v tabulce označena jako sloučenina 12).

Tabulka č. 19: Aktivita připravených látek proti *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.

Sloučenina	MIC [μg/ml]	% inhibice
1	>6.25	0
2	>6.25	14
3	>6.25	14
4	>6.25	0
5	>6.25	0
6	>6.25	0
7	>6.25	0
8	>6.25	0
9	>6.25	0
10	>6.25	54
11	>6.25	72
12	>6.25	69

### 4.3. Antialgální aktivita

#### Inhibice vývoje kyslíku v chloroplastech

Antialgální aktivita byla u zkoumaných látek měřena na základě inhibice vývoje kyslíku v chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea* L.). Podle popsané metodiky<sup>67</sup> byla inhibice stanovena spektrofotometricky (Specord UV = VIS Zeiss, Jena, Německo) v přítomnosti 2,6-dichlorindofenolu (DPIP) jako akceptoru elektronů. Látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu v koncentraci  $5 \cdot 10^{-5}$  mol.l<sup>-1</sup>. Inhibiční aktivita studovaných látek byla vyjádřena v hodnotách IC<sub>50</sub>, což odpovídá molární koncentraci látky způsobující 50% pokles produkce kyslíku oproti kontrolní skupině. Aktivity studovaných látek byly porovnány s hodnotou IC<sub>50</sub> selektivního herbicidu DCMU; systematicky 3-(3, 4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea<sup>68</sup>.

#### Testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*

Zelená řasa *Ch. vulgaris* byla kultivována při pokojové teplotě metodou dle Králové<sup>69</sup>. Účinek sloučenin na obsah chlorofylu v řasách byl zjišťován po 4-denní

kultivaci řas v přítomnosti sledované látky, byl stanoven spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Munchen, Germany) po extrakci chlorofylu methanolem podle Wellburna<sup>70</sup>. Látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v DMSO, kontrolní vzorky obsahovaly stejné množství DMSO jako testované. Antialgální aktivita je vyjádřena jako IC<sub>50</sub>, jako standard byl použit DCMU.

**Tabulka č. 20: Herbicidní aktivita připravených látek (srovnání s účinností standardu DCMU).**

	Redukce obsahu chlorofylu ( <i>Chlorella vulgaris</i> )	Inhibice fotosyntézy ( <i>Spinacia oleracea</i> )	
	IC <sub>50</sub> [mmol.dm <sup>-3</sup> ]	log (1/IC <sub>50</sub> ) [mol.dm <sup>-3</sup> ]	IC <sub>50</sub> [mmol.dm <sup>-3</sup> ]
1	-	3.4238	0.377
2	<b>0.041</b>	3.5373	0.290
3	<b>0.022</b>	3.5818	0.262
4	-	4.3271	0.047
5	-	3.9871	0.103
6	-	Není k dispozici	Není k dispozici
7	-	3.0338	0.925
8	-	3.8147	0.153
9	-	4.2177	0.061
10	-	3.3874	0.410
11	-	3.8430	0.143
<b>DCMU</b>	<b>0,0019</b>	<b>5,1367</b>	<b>IC<sub>50</sub> = 7,3 μmol.dm<sup>-3</sup></b>

## 5. DISKUSE

Ve své rigorózní práci jsem se zaměřil na syntézu látek ze skupiny amidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Na katedře již bylo v minulosti připraveno několik sérií látek tohoto typu<sup>71,72,73,74,75,76,77,78</sup>.

Série 11 látek byla připravena reakcí chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny s příslušnými aminy. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

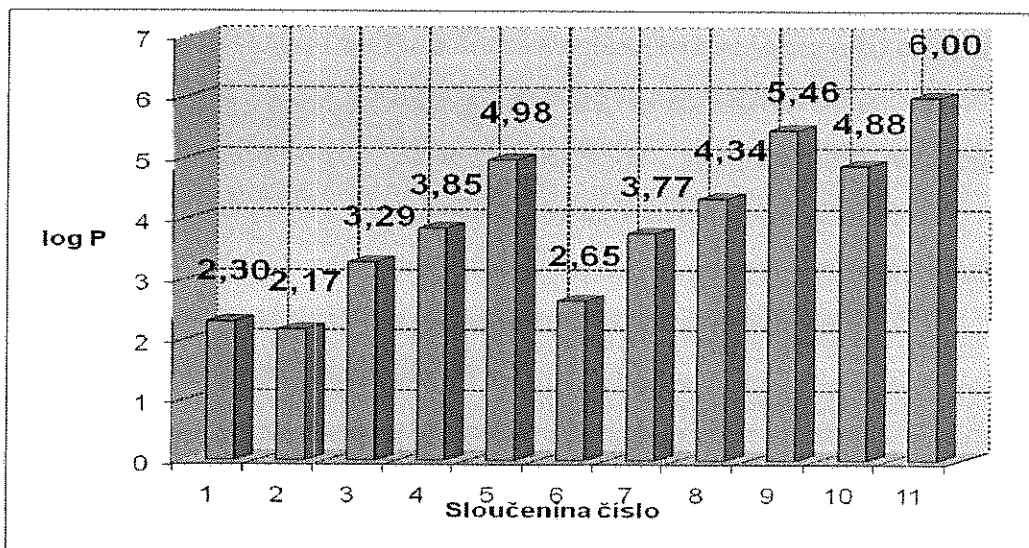
1. příprava chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém toluenu
2. vlastní syntéza amidu příslušné kyseliny aminolýzou

Jestliže byl reagujícím aminem 4-bromanilin, 3-chloranilin, 2,6-dichloranilin nebo 4-amino-2,6-dibromfenol, pak reakce proběhla většinou hladce a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 18 % - 97,1 %. Avšak v případě 2,4-dibrom-6-nitroanilinu ani 2-nitroanilinu reakce neprobíhala, což by se dalo vysvětlit záporným mezomerním efektem nitroskupiny, která snižuje bazicitu a reaktivitu aminoskupiny, jejíž elektronový pár je důležitý pro iniciační fázi aminolýzy.

Jednotlivé látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter a elementární analýzy. Čištění látek jsem prováděl rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

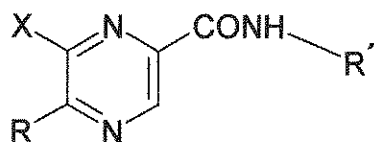
Log *P* sloučenin (viz graf č. 1) jsem vypočetl pomocí programu ACD/log *P* ver.1.0. (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Log *P* sloučenin se pohybovala mezi 2,30 – 6,00.

Graf č.1: Log *P* připravených látek.





Tabulka č. 21: Antimykobakteriální aktivita, vyjádřená v % inhibice, připravených látek.



Sloučenina	X	R	R'	Log P	Antimykobakt. Aktivita % inhibice
1	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -4-Br	2,30	0
2	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	2,17	14
3	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,29	14
4	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,85	0
5	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	4,98	0
6	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	2,65	0
7	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	3,77	0
8	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	4,34	0
9	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	5,46	0
10	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	4,88	54
11	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	6,00	72
12*	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	4,31	69

Látky vykazující antimykobakteriální aktivitu při MIC > 6.25 µg.ml<sup>-1</sup> se nacházely v rozmezí log P = 2,17 – 6,00. Nejúčinnější látky byly získány, pokud byl k aminolýze použit 4-amino-2,6-dibromfenol. Zavedení terc-butylu do polohy 5 a chloru do polohy 6 pyrazinového jádra v této skupině látek se jeví jako nejvýhodnější. Odstranění terc-butylu z polohy 5 mělo za následek pokles aktivity asi jen 1,04×, kdežto při odstranění chloru z polohy 6 klesne aktivita 1,33×. Slabou aktivitu též vykazovaly látky s 3-chloranilinem, coby reagujícím aminem. Zavedení terc-butylu do polohy 5 v této skupině sloučenin mělo za následek úplné vymizení aktivity. Vztah mezi lipofilitou a antimykobakteriální aktivitou nelze prokázat (viz tabulka č. 21).

Antimykobakteriálně nejúčinnější byly (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (11), log P = 6,00 a (3,5-dibrom-4-

\* Aktivita látky číslo 12 uvedena pro lepší demonstraci vztahu účinku a antimykobakteriální aktivity viz. str. 88.



hydroxyfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny (10),  $\log P = 4,88$ . Ani jedna z látek však nesplnila kritérium více jak 90% inhibice, které je nutné pro postup do dalšího testování.

**Tabulka č. 22: Antifungální aktivita**

**Legenda: (0 aktivita žádná; (+) aktivita velmi slabá nebo žádná; + aktivita slabá; ++ aktivita střední; +++ aktivita silná; - látka netestována).**

Sloučenina	X	R	R'	Log P	antifung. MIC
1	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -4-Br	2,30	+
2	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	2,17	0
3	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,29	+
4	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,85	0
5	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	4,98	0
6	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	2,65	0
7	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	3,77	0
8	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	4,34	+
9	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	5,46	0
10	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	4,88	++
11	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	6,00	++
ketokonazol	-	-	-	4,01	0,24 – 31,25 mmol·dm <sup>-3</sup>

Antifungálně účinné látky se nacházely v rozmezí  $\log P = 2,30 - 6,00$ . Z použitých aminů byl nejvýhodnější 4-amino-2,6-dibromfenol. Substituce 3-chloranilinem, 2,6-dichloranilinem a 4-bromanilinem měla za následek pokles aktivity. Z výše uvedených výsledků nelze jednoznačně odhalit, jaký obecný vliv má substituce chlorem, terc-butylem a terc-butylem a chlorem současně na pyrazinovém jádře na antifungální aktivitu.

Antimykoticky nejúčinnější látky byly (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (11),  $\log P = 6,00$  a (3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny (10),  $\log P = 4,88$ , a to

zejména proti kmenům *Trichophyton mentagrophytes* 445, *Candida albicans* ATCC 44859. Ve srovnání s ketokonazolem však byla antifungální aktivita malá, jak ve smyslu řádově vyšších MIC testovaných látek, tak ve smyslu užšího spektra účinku.

**Tabulka č. 23: Antialgální aktivita.**

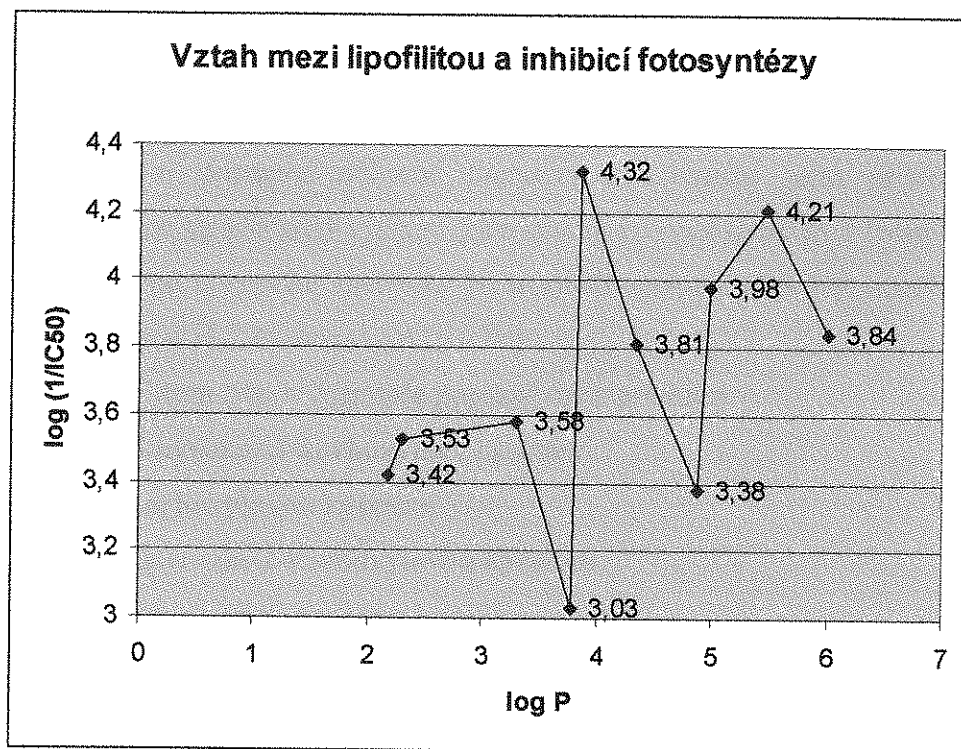
Sloučenina	X	R	R'	Log P	IC <sub>50</sub> (mmol·dm <sup>-3</sup> )	Redukce obsahu chlorofylu ( <i>Chlorella vulgaris</i> ) IC <sub>50</sub> (mmol·dm <sup>-3</sup> )
1	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -4-Br	2,30	0.377	<i>a</i>
2	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	2,17	0.290	<b>0.041</b>
3	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,29	0.262	<b>0.022</b>
4	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	3,85	<b>0.047</b>	<i>a</i>
5	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3-Cl	4,98	0.103	<i>a</i>
6	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	2,65	Není dostupné	<i>a</i>
7	Cl	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	3,77	0.925	<i>a</i>
8	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	4,34	0.153	<i>a</i>
9	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -2,6-Cl <sub>2</sub>	5,46	<b>0.061</b>	<i>a</i>
10	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	4,88	0.410	<i>a</i>
11	Cl	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -3,5-Br <sub>2</sub> -4-OH	6,00	0.143	<i>a</i>
DCMU	-	-	-	1,03	0,0073	0,0019

*a* hodnoty IC<sub>50</sub> neměřitelné z důvodu velkých rozdílů mezi jednotlivými měřeními.

Látky výrazněji inhibující fotosyntézu v chloroplastech špenátu měly rozmezí log *P* = 3,85 - 6,00. V sérii anilidů tvořených 2,6-dichloranilinem aktivita roste se vzrůstající hodnotou log *P*. Zavedení terc-butylu do polohy 5 a chloru do polohy 6 pyrazinového jádra v této skupině látek mělo za následek zvýšení aktivity více jak 15×. V sérii látek tvořených 3-chloranilinem substituce terc-butylem v poloze 5 pyrazinového jádra zvýšila aktivitu více jak 6×, současné zavedení chloru do polohy 6 však snížilo tuto aktivitu více jak o polovinu. Naproti tomu ve skupině látek, kde anilid tvoří 4-amino-2,6-dibromfenol zavedení chloru do polohy 6 pyrazinového jádra zvýšilo aktivitu téměř 3×.

Jak je patrné z tabulky č. 20 a následně z grafu č. 2 nelze vyvodit závěr, že schopnost látek inhibovat fotosyntézu je jednoznačně funkcí log *P*. Látka číslo 6 nebyla testována z důvodu nízké rozpustnosti v testovacím médiu.

Graf č.2.



Nejaktivnější látky byly (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny (4),  $\log P = 3,85$  a (2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (9),  $\log P = 5,46$ . Ve srovnání se standardem DCMU byly však tyto látky 6,4× a 8,3×, v uvedeném pořadí, méně aktivní.

Hodnota  $IC_{50}$ , co by ukazatel redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*, se dala stanovit pouze u 2 látek, a to u (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny (2),  $\log P = 2,17$  a (3-chlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (3),  $\log P = 3,29$ . Ve srovnání se standardem DCMU jsou hodnoty  $IC_{50}$  však 21,6× a 11,6×, ve výše uvedeném pořadí, vyšší. U ostatních látek (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) se v koncentračním intervalu 0.83 – 100  $\mu\text{mol dm}^{-3}$  dal vyhodnotit pouze průměr. Pokles obsahu chlorofylu v studovaném koncentračním intervalu však byl statisticky významný vůči kontrole a pohyboval se v rozmezí 7.8 - 18.7 %. Dalo by se uvažovat, že redukce obsahu chlorofylu by mohla být způsobena negativním ovlivněním enzymatických procesů spojených se syntézou chlorofylu.

## 6. ZÁVĚR

V rámci této rigorózní práce jsem splnil následující úkoly:

1. S použitím dostupné odborné literatury a internetu jsem provedl rešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě a trendy v terapii.
2. V dostupné chemické literatuře jsem zjistil metody přípravy substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravil jsem tyto, v literatuře popsané, meziproducty:

**4-oxid amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**pyrazin-2-karboxylovou kyselinu**

**5-terc-butylpyrazin-2-karboxylovou kyselinu**

**4-oxid pyrazin-2-karboxylovou kyselinu**

**6-chlorpyrazin-2-karboxylovou kyselinu**

**5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylovou kyselinu**

dále v literatuře popsány<sup>64</sup>, produkt:

**(4-bromfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny**

a tyto, v literatuře nepopsané, produkty:

**(3-chlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(3-chlorfenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(3-chlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(3-chlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(2,6-dichlorfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(2,6-dichlorfenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(2,6-dichlorfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

**(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny**

Výše uvedené produkty jsou charakterizovány elementární analýzou, teplotou tání, TLC, IČ, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektry.

4. Série látek jsem podrobil *in vitro* biologickému hodnocení:  
Byly získány údaje o antimykobakteriální a antifungální aktivitě a dále výsledky testů inhibice fotosyntézy a redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*.
5. Vypočetl a graficky zpracoval log *P* nově připravených látek:  
Log *P* připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 2,30 – 6,00.
6. Pokusil jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (viz Diskuse).

Výsledky této rigorózní práce budou dále publikovány.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. DOLEŽAL, M.; JAMPÍLEK, J.; OSIČKA, Z.; et al.: *Farmaco* **2003**, 58, 1105.
2. OSIČKA, Z.: *Diplomová práce*. FaF UK, Hradec Králové 2003.
3. JAMPÍLEK, J.; DOLEŽAL, M.; KUNEŠ, J.; et al.: Sborník XXXI. konference „*Syntéza a analýza léčiv*“, 11. až 13. září 2002, Bratislava, str. 60.
4. JAMPÍLEK, J.; DOLEŽAL, M.; OSIČKA, Z.; et al.: Sborník XXXII. konference „*Syntéza a analýza léčiv*“, 16. až 19. září 2003, Velké Karlovice, str. 134.
5. JAMPÍLEK, J.; DOLEŽAL, M.; OSIČKA, Z.; et al.: *7th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-7)*, November 1-30, 2003 (<http://www.mdpi.org/ecsoc-7.htm>).
6. MATYSIAK-SYLWESTRZAK, B.: *Medicus* **2001**, 2, 24.
7. <http://www.taacf.org/about-TB-background.htm> (12.10.2008).
8. <http://www.who.int/tb/challenges/en/> (20. 10. 2008)
9. <http://www.m-ww.de/krankheiten/infektionskrankheiten/tuberkulose.html> (28.2.2006).
10. <http://www.uzis.cz> (26.10.2008)
11. MACELA, A.; et al.: *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Praha: Grada Publishing, 2006. 216 s.
12. GREENWOOD, D.; SLACK, R., C., B.; PEUTHERER, J., F.; et al.: *Lékařská mikrobiologie. Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada Publishing, 1999. 686 s.
13. ZAHRADNICKÝ, J.; et al.: *Mikrobiologie a epidemiologie*. Praha: Avicenum, 1981. 678 s.
14. COLE, S., T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; et al.: *Nature* **1998**, 393, 537.
15. DRAPER, P.: *Nat. Med.* **2000**, 6, 977.
16. BERTHET, F., X.; LAGRANDERIE, M.; GOUNON, P.; et al.: *Science* **1998**, 282, 759.
17. CAMACHO, L., R.; ENSERGUEIX, D.; PEREZ, E.; et al.: *Mol. Microbiol.* **1999**, 34, 257.
18. COX, J., S.; CHEN, B.; McNEIL, M.; et al.: *Nature* **1999**, 402, 79.
19. BELISLE, J., T.; BELISLE, J., T.; VISSA, V., D.; et al.: *Science* **1997**, 276, 1420.

- 
20. DUBNAU, E.; FONTAN, P.; MANGANELLI, R.; et al.: *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 630.
  21. RAYNAUD, C.; PAPA VINASASUNDARAM, K., G.; SPEIGHT, R., A.; et al.: *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 191.
  22. <http://www.wadsworth.org/databank/mycotubr.htm> (27.10.2008)
  23. HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; et al.: FARMACEUTICKÁ CHEMIE IV. Praha: Karolinum, 2006. 166 s.
  24. BUCHMEIER, N.; BLANC-POTARD, A.; ERT, S.; et al.: *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 1375.
  25. QUADRI, L., E.; SELLO, J.; KEATING, T., A.; et al.: *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 631.
  26. SCHMITT, M., P.; PREDICH, M.; DOUKHAN, L.; et al.: *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 4284.
  27. BARCO, P.; CARDOSO, R., F.; HIRATA, R., D., C.; et al.: *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 930.
  28. EOH, H.; BROWN, A., C.; BUETOW, L.; et al.: *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8922.
  29. BUCHTA, V.; JÍLEK, P.; HORÁČEK, J.: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum, 1998. 192 s.
  30. [http://www.zdravcentra.cz/index.php?act=m-1&infekce\\_id=48](http://www.zdravcentra.cz/index.php?act=m-1&infekce_id=48) (13.10.2006).
  31. KONNO, K.; FELDMANN, F., M.; McDERMOTT, W.: *Am. Rev. Respir. Dis.* **1967**, *95*, 461.
  32. ZIMHONY, O.; COX, J., S.; WELCH, J., T.; et al.: *Nat. Med.* **2000**, *6*, 1043.
  33. BOSHOFF, I., H.; MIZRAHI, V.; CLIFTON, E., B.: *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2167.
  34. ZHANG, Y.; MITCHISON, D., A.: *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2003**, *7*, 6.
  35. ZIMHONY, O.; VILCHÈZE, C.; ARAI, M.; et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 752.
  36. WADE, M., M.; ZHANG, Y.: *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 936.
  37. WADE, M., M.; ZHANG, Y.: *J. Med. Microbiol.* **2004**, *53*, 769.
  38. SOMOSKOVI, A.; WADE, M., M.; SUN, Z.; et al.: *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 192.
  39. BYRNE, S., T.; DENKIN, S., M.; ZHANG, Y.: *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 313.
  40. IBRAHIM, M.; ANDRIES, K.; LOUNIS, N.; et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1011.

41. JANIN, Y., L.: *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2479.
42. SEITZ, L., E.; SULING, J., W.; REYNOLDS, R., C.: *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5604.
43. KOS, S.: *Postgraduální medicína* **2006**, *8*, 639.
44. PRATT, Y., T.: Pyrazines and Piperazines. In: *Heterocyclic Compounds*. Vol. 6, (R.C Elderfield, Ed.), J. Willey & Sons, Inc., New York 1957.
45. POŽARSKII, A., F.: *Chim. Geterocicl. Sojedin.* **1985**, *7*, 867.
46. CHEESEMAN, G., W., H.; WESTINK, E., S., G.: *Recent Advances in Pyrazine Chemistry*. In: *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Vol. 14, (A.R Katritzki, A.J. Boulton, Ed.), Academic Press, New York 1972.
47. BLACK, P., J.; Mc DOWELL, C., A.: *Mol. Phys.* **1967**, *12*, 233. In: *Chem Abstr.* **1967**, *67*, 77716f.
48. KWIATOWSKI, S.; ZURAWSKI, B.: *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Math. Astron. Phys.* **1965**, *13*, 489. In: *Chem. Abstr.* **1966**, *64*, 15719.
49. BLACK, P., J.; BROWN, R., D.; HEFFERMAN, M., Z.: *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 1305. In: *Chem. Abstr.* **1967**, *67*, 48883.
50. TAKAHI, Y.; YASATA, Y.; WATANABE, T.: *Acta Crystallogr.* **1960**, *13*, 693. In: *Chem. Abstr.* **1960**, *54*, 23591e.
51. KLEIN, B.; BERKOWITZ, J.: *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5160.
52. SATO, N.: *J. Chem. Res.* **1984**, S318.
53. AMBROGI, V.: *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 157.
54. HARTL, J.; DOLEŽAL, M.; KRINKOVÁ, J.; et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1109.
55. DLABAL, K.; PALÁT, K.; LYČKA, A.; ODLEROVÁ, Ž.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1990**, *55*, 2493.
56. OPLETALOVÁ, V.; PATEL, A.; BOULTON, M.; et al.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093.
57. HEINISCH, G.; LOETSCH, G.: *Synthesis* **1988**, 119.
58. HOUMINER, Y.; SOUTHWICK, E., W.; WILLIAMS, D., L.: *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 640.
59. KUSHNER, S.; DALALIAN, H.; SANJURJO, J., L.; et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 617.
60. DOLEŽAL, M.: *Doktorská disertační práce*. FaF UK, Hradec Králové 1996.



61. PHILIPPE, A., P.: *J. Amer. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5822.
62. BOISSONAS, R., A.: *Helv. Chim. Acta* **1951**, *34*, 874.
63. ČERVINKA, O.; et al.: *Chemie organických sloučenin*, 2. díl, SNTL, Praha: SNTL, 1987. 1131 s.
64. VONTOR, T.; PALÁT, K.; DANĚK J.; et al.: *Česko-Slovenská farmacie* **1989**, *38*, 393.
65. KUSHNER, S.; DALALIAN, H.; SANJURJO, J., L.; et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3617.
66. DOLEŽAL, M.; PALEK, L.; VINŠOVÁ, J.; et al.: *Molecules* **2006**, *11*, 242.
67. KRÁLOVÁ, K.; ŠERŠEŇ, F.; SIDÓOVÁ, E.: *Chem. Pap.* **1992**, *46*, 348.
68. CARPENTIER, R.; FUERST, E., P.; NAKATANI, H., Y.; et al.: *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *808*, 293.
69. KRÁLOVÁ, K.; ŠERŠEŇ, F.; MELNIK, M.: *J. Trace Microprobe Techn.* **1998**, *16*, 491.
70. WELLBURN, A., R.: *J. Plant. Physiol.* **1994**, *144*, 307.
71. DOLEŽAL, M.; HARTL, J.; MILETÍN, M.; et al.: *Chem. Pap.* **1999**, *53*, 126.
72. DOLEŽAL, M.; VIČÍK, R.; MILETÍN, M.; et al.: *Chem. Pap.* **2000**, *54*, 245.
73. DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; HARTL, J.; et al.: *4th Int. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4)*, September 1-30, 2000 (<http://www.unibas.ch/mdpi/ecsoc-4/c0028/c0028.htm>).
74. DOLEŽAL, M.; HARTL, J.; MILETÍN, M.; et al.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2000**, *25*, 15 (<http://www.faf.cuni.cz/fovia/25/2502dolezal.htm>).
75. DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; HEJSKÝ, R.; et al.: *5th Int. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-5)*, September 1-30, 2001 (<http://www.mdpi.net/ecsoc-5/c0009/c0009.htm>).
76. DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; KUNEŠ, J.; et al.: *Molecules* **2002**, *7*, 363 (<http://www.mdpi.net/molecules/papers/70300363.pdf>).
77. DOLEŽAL, M.; KUTILOVÁ, H.; KRÁLOVÁ, K.; et al.: *6th Int. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-6)*, September 1-30, 2002 ([http://www.mdpi.net/ec/ec\\_article.php?id=93&file=papers/ecsoc-6/213/213.htm](http://www.mdpi.net/ec/ec_article.php?id=93&file=papers/ecsoc-6/213/213.htm)).
78. DOLEŽAL, M.; KRÁLOVÁ, K.; ŠERŠEŇ, F.; et al.: *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2001**, *26*, 13 (<http://www.faf.cuni.cz/fovia/26/2602dolezal.htm>).