

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

**Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv**

**DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.**

**Hradec Králové, 2010**

**Drahomíra Eibinová**

## PROHLÁŠENÍ

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

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

V Hradci Králové dne 30.4.2010

Podpis : .....

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu této práce **doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.** za odborný dohled, cenné rady a připomínky při zpracování. Děkuji také za zpracování dat pracovníkům Katedry organické a anorganické chemie, Mgr. Vejsové a paní Dufkové za testy antimikrobní a antifungální aktivity.

## **Abstrakt**

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

Diplomová práce zahrnuje rešerši zabývající se současným významem tuberkulózy a novými přístupy k její terapii. V chemické literatuře byly zjištěny metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Experimentální část se týká syntézy šesti v chemické literatuře dosud nepopsaných látek charakteru substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Produkty byly charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ,  $^1\text{H}$ , popř.  $^{13}\text{C}$  NMR spektry. Tyto sloučeniny byly dále podrobeny *in vitro* biologickému hodnocení. Práce přináší nové údaje o antimykobakteriální a antifungální aktivitě, jsou uvedeny i vypočtené hodnoty log P nově připravených látek.

## **Abstract**

Theme of diploma thesis: **Synthesis of Pyrazine Derivates as Potential Antituberculotics I.**

My diploma thesis comprises recherche concerned with contemporary importance of tuberculosis and new treatment approaches in its therapy. We have found out the methods of synthesis of amides of pyrazinecarboxylic acid derivates in chemical literature. Experimental part deal with synthesis of six new amides on the basis of pyrazinecarboxylic acid derivates, till now not published. Newly synthesized compounds have been characterized by melting points, TLC, elemental analysis, IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. *In vitro* data of eight new compounds are presented. My diplomat thesis brings new antimycobacterial data, antifungal data and log P values are calculated.

# Obsah

1	ÚVODNÍ ČÁST .....	6
1.1	Tuberkulóza .....	6
1.1.1	Epidemiologie, průkaz onemocnění .....	9
1.1.2	Etiologie a přenos infekce .....	12
1.2	Terapie tuberkulózy .....	13
1.2.1	Chemoterapie .....	14
1.2.2	Vakcinace .....	20
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	21
2.1	Pyrazin (1,4-diazin) – vlastnosti .....	21
2.2	Pyrazin (1,4-diazin) – reakce .....	22
3	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	26
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
4.1	Přístroje a chemikálie .....	27
4.2	Schémata prováděných reakcí .....	28
4.2.1	Výchozí látky .....	28
4.2.2	Příprava vlastních anilidů .....	28
4.3	Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	29
4.3.1	Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	29
4.3.2	Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny .....	29
4.4	Připravené sloučeniny a jejich charakteristiky .....	30
4.4.1	N-(3-jod-4-methylfenyl)-5-methyl pyrazin-2-karboxamid .....	31
4.4.2	N-(5-fluor-2-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid .....	32
4.4.3	5-methyl-N-fenylpyrazin-2-karboxamid .....	33
4.4.4	N-[4-(dimethylamino)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid .....	34
4.4.5	N-[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid .....	35
4.4.6	N-(3-methoxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid .....	36
4.5	Vypočítaná hodnota log P připravených látek .....	37
5	BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ .....	38
5.1	Antituberkulotická aktivita, TAACF .....	38
5.2	Antimykotická aktivita .....	40
5.3	Antibakteriální aktivita .....	41
6	DISKUZE .....	42
	ZÁVĚR .....	46
	LITERATURA .....	47

# 1 ÚVODNÍ ČÁST

## 1.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza patří k nejstarším onemocněním lidstva. Za první doklad o její existenci se považuje nález z doby neolitické, který učinil roku 1904 Pfaff u Heidelbergu. V české historii jsou první zmínky o TBC popisovány u několika členů rodu Přemyslovců. Největším objevem v dějinách tuberkulózy byl v roce 1882 průkaz původce onemocnění Robertem Kochem (odtud Kochův bacil). V roce 1891 objevil Koch také tuberkulin. V roce 1921 byla připravena francouzskými bakteriology Calmettem a Guérinem první vakcína, obsahující oslabený kmen *Mycobacterium. bovis*. Tento kmen byl nazván jako bacil Calmettův - Guérinův (BCG) a očkování proti TBC kalmetizací.

Po objevení původce, bylo cílem objevit účinný lék. Do té doby se doporučovalo podávání vitamínů, klid na lůžku a klimatická léčba. Léčba sice zpomalovala průběh onemocnění, ale to zpravidla končilo smrtelně. Obrat nastal na konci 2. světové války objevením tří antituberkulotik v krátkém časovém sledu (1944 streptomycin, 1946 kyselina p-aminosalicylová, 1952 využití antimikrobiálního účinku kyseliny isonikotinové). Počátek účinné antituberkulotické léčby se datuje od 50. let 20.století. Postupně byly formulovány principy používání těchto látek (podávání v kombinaci, rozlišení fáze léčby).

Za nejvhodnější diagnostiku bylo zpočátku považováno rtg. vyšetření, které přerostlo do plošně používaného snímkování ze štítu. V současné době je většina nových pacientů zjišťována pasivně, tedy pro obtíže (nejčastěji kašel, subfebrilie, únavnost). Jenom malá část je vyhledávána aktivně při vyšetřování rizikových skupin obyvatelstva (kontakty s aktivní TBC, imigranti, vězňové, bezdomovci, alkoholici)<sup>1</sup>.

### Tuberkulóza ve světle 21. století

V zemích Evropské unie je stav poměrně příznivý - výskyt choroby je nižší než padesát případů na sto tisíc obyvatel. Ve světě je však infikován tuberkulózním bacilem jeden člověk ze tří, nově nemoc propuká u devíti milionů obyvatel za rok a na tuberkulózu ve světě ročně umírá kolem dvou milionů lidí<sup>1,2</sup>.

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

Kromě "klasické" citlivé formy TBC je již několik let známa multirezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant TBC - MDR TBC) charakterizovaná rezistencí minimálně na dvě neúčinnější léčiva isoniazid a rifampicin. WHO odhaduje výskyt nových případů MDR TBC na půl milionu ročně ve více než 80 zemích světa a přibližně čtvrtina těchto osob na toto onemocnění zemře.

Dále existuje i tzv. extrémně rezistentní tuberkulóza (extensively drug-resistant TBC- XDR TBC). V těchto případech jde o kombinaci MDR TBC umocněnou další rezistencí mykobakteriálního kmene na fluorochinolonové antibiotikum a současně ještě jeden z injekčních přípravků, kapreomycin, kanamycin nebo amikacin. Dnes se předpokládá, že kolem 10 % případů MDR TBC je již XDR TBC. Je to však počet podhodnocený, protože ne ve všech zemích je k dispozici kvalitní laboratorní zázemí s možností provádět testy lékové citlivosti na antituberkulotika nižších tříd. XDR TBC byla zaznamenána již v téměř 50 zemích <sup>1,2</sup>

V roce 2009 byla diagnostikována další rezistentní forma TBC - totálně rezistentní TBC (totally drug-resistant TBC - TDR TBC). Je to dosud nejzávažnější varianta TBC. Je definována rezistencí kmene *Mycobacterium tuberculosis* na všechna antituberkulotika první a druhé řady. První případy byly popsány u pacientů z různých zemí Asie - Íránu, Iráku, Afghánistánu.

Tuberkulóza zůstává i v 21. století stále významným medicínským a sociálním fenoménem. Otevřením hranic, při zvýšené migraci obyvatel z východní Evropy a Asie, rozvoji pandemie AIDS, a tím nárůstu počtu pacientů se sníženou imunitou, při rozšiřující se toxikománii a léčbě ovlivňující imunitní systém nabývá problém TBC na aktuálnosti.

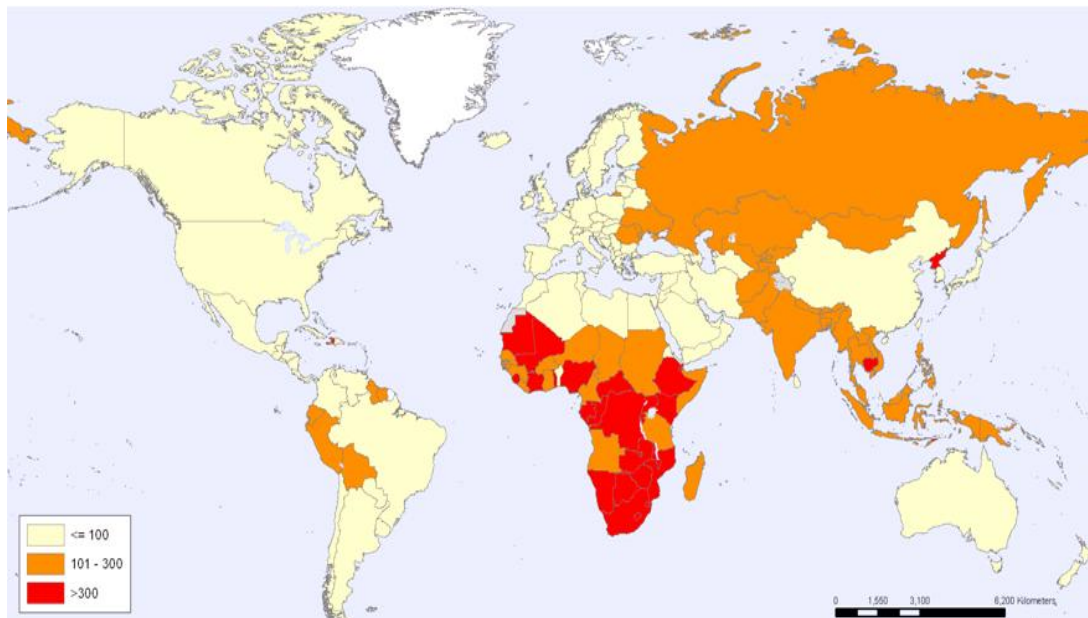
V současné době probíhají klinické studie, jež mají na základě příznivých výsledků doporučit zkrácení celkové doby léčby přibližně na čtyři měsíce. Protože celosvětově je zaznamenán nárůst lékové rezistence k dosud používaným léčivům TBC, předpokládá se také zavedení nových antituberkulózních přípravků do lékových režimů kolem roku 2015 <sup>2</sup>.

## Perspektivy TBC

Lze předpokládat, že do budoucna se budeme více setkávat s obtížně léčitelnými formami TBC vzhledem k narůstající lékové rezistenci. V ČR se zvyšuje počet cizinců především u rezistentních forem TBC. U MDR TBC představují více než  $\frac{1}{3}$  všech pacientů. Obdobná situace byla zaznamenána v Rakousku. Cizinci zde v posledních letech představují kolem  $\frac{1}{3}$  případů TBC, ale u MDR TBC jsou zastoupeny až v 90 % onemocnění.

Léčba MDR TBC je v průměru 80x dražší než citlivá TBC. U všech případů TBC se realizují testy lékové citlivosti ke zjištění, o jakou formu TBC jde. Neadekvátní léčba vede již po 4 týdnech k výskytu MDR TBC.

Pacientům, kteří byli pro TBC již dříve léčeni, je třeba věnovat zvýšenou pozornost. Právě u těchto osob je riziko MDR TBC ve 20 až 80 % případů. Naopak riziko onemocnět primárně touto rezistentní formou TBC se pohybuje kolem 1,4 % a tento údaj vypovídá o úrovni kontrolních národních programů TBC <sup>2</sup>.



Obrázek 1 Odhad nových případů TBC (zdroj WHO)



### 1.1.1 Epidemiologie, průkaz onemocnění

Tuberkulóza (TBC) je celkové chronické infekční onemocnění, které je řazeno mezi specifické zánětlivé procesy. Jde o granulomatózní zánět způsobený mikroblem *Mycobacterium tuberculosis*. Název onemocnění je odvozen od latinského slova *tuberculosum* (uzlíček). Má dva základní morfologické typy: tuberkulózní uzlík a tuberkulózní exudát. Uzlík představuje produktivní formu, druhý typ exsudativní formu zánětu. Tyto projevy se mohou v různém rozsahu kombinovat a často k nim přistupuje další charakteristický znak - zesýrovatění, tj. kaseifikace tkáně<sup>1,3</sup>.

Nejčastějším projevem onemocnění je tuberkulóza plic. Charakterizuje ji zánět plicní tkáně. Postižená místa se rozpadají a vyprazdňují. Na jejich místě vznikají typické dutiny – kaverny. Nemoc provází zduření lymfatických uzlin, horečka a celkové vyčerpání organismu. Nemocní trpí kašlem, jsou unavení a ztrácejí tělesnou hmotnost. Při vyprázdnění ložisek zánětu do dýchacích cest se může k obtížím přidat vykašlávání krve s množstvím bakterií, které jsou zdrojem další infekce<sup>4</sup>.

Podle lokalizace se TBC rozděluje na:

- TBC dýchacího systému, která představuje asi 80 % případů a
- TBC mimoplicní okolo 20 %, kde jsou zasaženy hlavně mízní uzliny, kosti, klouby.

Po styku s infekčním agens může organismus reagovat různě. Zpravidla jde o následující tři typy reakcí:

- 1/ organismus není infikován;
- 2/ organismus je infikován, ale nedochází k manifestaci onemocnění;
- 3/ propukne manifestní onemocnění. Příčinou může být velké množství a vysoká virulence mykobakterií, nebo snížená imunita<sup>1</sup>

Manifestní onemocnění dělíme na primární a postprimární.

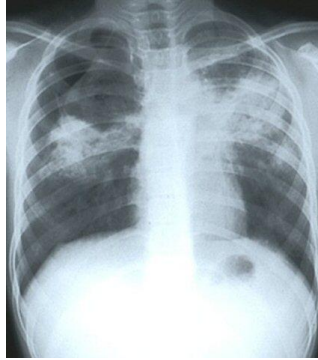
**Primární tuberkulóza**, tzv. primoinfekce, vzniká při prvním kontaktu člověka s infekčním agens. Základním znakem je postižení regionálních uzlin, hlavně plicní tkáně, které odpovídají místu průniku mykobakterií do organismu. Mykobakterie se kumulují v makrofázích a mohou vytvářet tzv. tuberkulózní uzlíky. Primární tuberkulóza se projevuje hlavně nespecifickými příznaky (např. zvýšenou teplotou, nechutenstvím, snížením celkové aktivity) a ve většině případů dojde ke spontánnímu vyhojení. Tento typ je nejčastější v dětském věku, v případě dospělých mluvíme o „pozdní primoinfekci“<sup>1,2,3,4</sup>.

**Postprimární tuberkulóza** se projeví u osob, které prodělaly primární TBC. Může vznikat přímým přechodem z primární formy. Další možností, která je nejčastější, je *endogenní reaktivace* mykobakterií, které mají dlouhou generační dobu a jsou schopny ve spícím, tzv. dormantním stavu, přežívat řadu let. Jedná se o zbytková ložiska (odumřelé části tkáně), která se opouzdří a dochází zde k ukládání vápenatých solí (tzv. kalcifikace). Při nepříznivém vývoji nekróza kolikvuje a vzniká chorobná dutina, tzv. kaverna, s možností dalšího šíření infekce a zánětu. Postupné šíření TBC v plicích s četnými rozpady může vést ke krvácení a vykašlávání krve. Ke vzplanutí onemocnění může dojít vlivem nepříznivých podmínek, kterými mohou být vysoký věk, alkoholismus, oslabený imunitní systém, špatné životní a sociální podmínky<sup>1,2,3</sup>.

Mykobakterie uvolněné z tuberkulózních ložisek či z makrofágů cirkulují lymfatickým a krevním systémem do různých částí těla. Infikují hlavně retikuloendoteliární systém (slezinu, játra, lymfatické uzliny) a serózní bohatě prokrvené orgány (plíce, epifyzy rostoucích kostí, ledviny). V celém organismu tak vzniknou malé tuberkulózní uzlíky. Tomuto typu infekce říkáme akutní miliární tuberkulóza<sup>1,5</sup>. Méně častým způsobem vzniku postprimární TBC je tzv. *exogenní superinfekce*, kdy dojde k masivní expozici mykobakterií s následným vyvoláním onemocnění u člověka, který již TBC prodělal<sup>3,5</sup>.

## Diagnostika TBC

Pro stanovení diagnózy tuberkulózy je nejdůležitější bakteriologický průkaz *Mycobacterium tuberculosis* ve sputu pacienta. Následuje rentgenové vyšetření plic. Pomocnou diagnostickou metodou je tuberkulínový test.



Obrázek 2 Rentgenový snímek pacienta s TBC <sup>4</sup>

Dalšími pomocnými vyšetřovacími metodami může být bronchoskopie, bronchografie, hrudní punkce, pomocná laboratorní vyšetření...

Nově je zaveden pro diagnostiku tuberkulózní infekce nepřímý test QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB Gold, IGRA test). Jeho princip spočívá ve schopnosti lymfocytů jedince infikovaného *M. tuberculosis* po stimulaci specifickými mykobakteriálními antigeny produkovat interferon gama. Jeho průkaz tvoří základ tohoto testu. Jeho značnou výhodou v porovnání s tuberkulínovým kožním testem je vyšší senzitivita a specificita. Tuberkulínový test nemůže rozlišit aktuální a prodělanou TBC infekci.

Hodnota testu může být ovlivněna vakcinací, kontaktem s netuberkulózními mykobakteriemi, technikou intradermální aplikace, subjektivní interpretací výsledků. Uvedené nepřímé testy je nutné posuzovat jako pomocné metody při stanovení diagnózy TBC. Jejich případná negativní hodnota nevylučuje TBC onemocnění <sup>2</sup>.

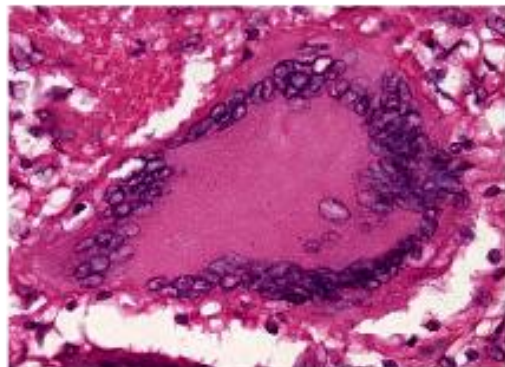
TBC patří mezi onemocnění, jež nejsou v diferenciální diagnostice často brána v úvahu. Protože jde o infekční chorobu a nemusí být včas poznána, může vést k šíření nákazy u osob v blízkém a dlouhodobém kontaktu. Je třeba na TBC pomýšlet při vyhodnocení všech nálezů, zvláště však těch nejasných, a při stanovení diagnózy provést základní vyšetření, která onemocnění potvrdí či vyloučí <sup>2</sup>.

### 1.1.2 Etiologie a přenos infekce

Původcem TBC je *Mycobacterium tuberculosis*, které řadíme do rodu *Mycobacterium*. Tento rod dále dělíme na mykobakteria klasická, jako je právě *M. tuberculosis* nebo *M. bovis* či *M. africanum* a mykobakteria atypická, ke kterým patří *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. srofulaceum*, ...

Mykobakteria se odlišují od ostatních mikroorganismů především skladbou buněčné stěny (obsahuje zejména tuky a vosky), dlouhou generační dobou (48 hodin), fakultativním intracelulárním parazitismem a schopností perzistence.

*Mycobacterium tuberculosis* je imobilní krátká tyčinka, 1,5 – 5,0  $\mu\text{m}$  velká, tvaru rovného nebo lehce zahnutého. Jde o aerobní mikroorganismus, jehož optimální růst sledujeme při teplotě 37-38 °C. Izolaci *Mycobacterium tuberculosis* od dalších mikroorganismů umožňuje jeho acidorezistence, která je způsobena obsahem lipidů v membráně mykobakteria <sup>8</sup>.



Obrázek 3 *Mycobacterium tuberculosis*(zdroj Kimicontrol)

V České republice se jako vyvolávající agens uplatňuje prakticky pouze *M. tuberculosis*. Infekce se přenáší zpravidla kapénkami z člověka vylučujícího tuberkulózní bacily na okolní subjekty. Po vniknutí tuberkulózního agens (nejčastěji do dýchacího ústrojí hostitele) může dojít ke vzniku infekce, která bývá následována tuberkulózním onemocněním a to za různě dlouhou dobu. Následky tuberkulózní infekce pro organismus závisí na množství a virulenci mykobakterií, na opakovaném styku s infekčním zdrojem, na stavu imunitního systému infikovaného jedince <sup>5</sup>.

## **1.2 Terapie tuberkulózy**

Význam onemocnění tuberkulózou v posledních letech stále vzrůstá. Tuberkulóza postihuje především lidi, kteří musí žít ve špatných životních podmínkách (podvýživa, nedostatečná hygiena, onemocnění s poruchou imunity). Navíc terapii ztěžuje vzrůstající rezistence tuberkulózních bakterií vůči rutinním antituberkulotikům. Úspěšná terapie je značně dlouhodobá a předpokládá každodenní užívání léků, mimoto vyžaduje medicínskou infrastrukturu, která v mnoha oblastech světa chybí <sup>6</sup>.

V léčbě TBC stále platí tři priority:

- rychlá diagnostika,
- izolace pacienta,
- léčba citlivými přípravky <sup>2</sup>.

Pro léčení TBC se osvědčila kombinovaná terapie. Kombinací se využívá zejména proto, že v populaci mykobakterií jsou vždy přítomni původci rezistentní vůči jednomu určitému chemoterapeutiku. Dochází k selekci mykobakterií a následné rezistenci na léčivo. Při kombinaci několika “tuberkulostatik” je výskyt rezistence nižší, avšak dle nejnovějších informací, které ve svém článku uvádí MUDr. V. Bártů, jsou nové kmeny mykobakterií více a více odolné i k antituberkulotikům první linie užitých v kombinaci a TBC se opět stává celosvětovou hrozbou <sup>2,6</sup>.

### 1.2.1 Chemoterapie

Jak již bylo zmíněno, užívá se k léčbě TBC terapie kombinovaná. Kombinace léčiv umožňuje užití jejich menších terapeutických dávek, neboť se účinky léčiv sčítají. Každá látka ovšem musí dosáhnout dostačující antibakteriálně účinné koncentrace v séru. Jelikož jsou dávky jednotlivých léčiv nižší, jsou i nežádoucí účinky menší, avšak z hlediska nežádoucích účinků, které při dlouhodobé léčbě vznikají, se musí pacient neustále sledovat.

V prvních měsících terapie se mnohonásobně kombinují

- isoniazid,
- rifampicin,
- pyrazinamid, navíc případně
- streptomycin nebo ethambutol.

Kromě těchto standardních léčiv jsou k dispozici rezervní léčiva <sup>6</sup>.

Následující tabulka znázorňuje terapeutické možnosti.

TERAPIE TBC	PRVNÍ DVA MĚSÍCE	ZBÝVAJÍCÍ MĚSÍCE
6 MĚSÍCŮ	PYRAZINAMID	ISONIAZID RIFAMPIN
9 MĚSÍCŮ	ETHAMBUTOL	ISONIAZID RIFAMPIN
12 MĚSÍCŮ	Po celou dobu RIFAMPIN ETHAMBUTOL PYRAZINAMID	

*Tabulka 1 Způsoby terapie tuberkulózy<sup>9</sup>*

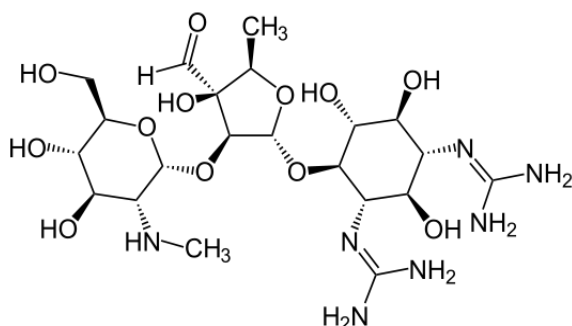
### 1.2.1.1 Antituberkulotika

Hlavními antituberkulotiky, které se dnes používají k léčbě TBC jsou jak látky ze skupiny antibiotik (streptomycin, rifampicin, kapreomycin, cykloserin), tak i chemoterapeutik (isoniazid, ethambutol, pyrazinamid, kyselina p-aminosalicylová) <sup>7</sup>.

Tato léčiva můžeme rozdělit na antituberkulotika první volby, kam řadíme isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, antituberkulotika druhé linie, kyselinu p-aminosalicylovou, kapreomycin, viomycin, cykloserin, ethionamid, kanamycin, streptomycin a léčiva rezervní např. protionamid, terizidon <sup>6,8</sup>.

### Antibiotika v léčbě TBC

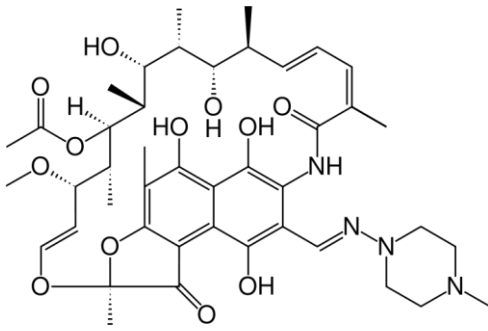
#### Streptomycin



Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum, jehož mechanismem účinku je inhibice syntézy proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30S. Jeho antimikrobní spektrum zahrnuje především *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella spp.*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas mallei* a další patogeny <sup>7</sup>.

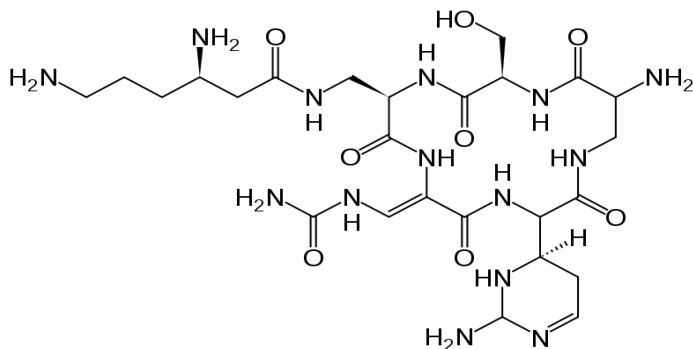
Z klinického hlediska jde o antituberkulotikum 1.řady určené pro léčbu tuberkulózy. Pro možnost rychlého rozvoje rezistence je používán převážně v kombinaci s dalšími antituberkulotiky <sup>6</sup>.

### Rifampicin



Rifampicin je polosyntetické antibiotikum úzkého antimikrobiálního spektra s bakteriostatickým účinkem. Je indikován jak v léčbě TBC, tak i dalších, především stafylokokových infekcích. Mechanismem účinku je inhibice syntézy bakteriální RNA blokadou RNA-polymerasy <sup>7</sup>.

### Kapreomycin

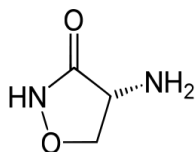


Kapreomycin je polypeptidové antibiotikum, účinkuje na mykobakterie, zejména kmeny *M.tuberculosis* izolované u lidí. Má často zkříženou rezistenci s viomycinem, méně s neomycinem a kanamycinem.

Je nefrotoxický a ototoxický, může způsobit poruchy CNS. Klinicky se užívá výhradně v kombinaci s jinými antituberkulotiky <sup>7</sup>.



### Cykloserin



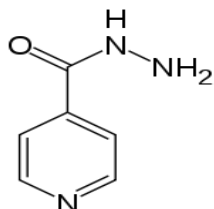
Cykloserin je širokospektré antibiotikum, derivát isoxazolidonu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny citlivých grampozitivních bakterií a *M. tuberculosis*.

Z jeho nežádoucích účinků je nejvýznamnější neurotoxicita a riziko náhlého selhání srdce (při dávkách 1-1,5 g denně).

Klinicky se uplatňuje v léčbě aktivní plicní a mimoplicní TBC (včetně renální formy) vyvolané kmenem s prokázanou citlivostí k cykloserinu v případech, kdy selhala léčba primárními antituberkulotiky.

### Chemoterapeutika v léčbě TBC

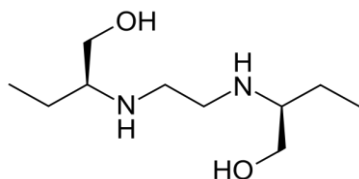
#### Isoniazid



Isoniazid je hydrazid kyseliny isonikotinové, který působí selektivně a baktericidně na extra- a intra- celulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky.

Isoniazid lze považovat za nejdůležitější antituberkulózní látku. Používá se k léčení TBC v kombinaci s jinými léčivy a k profylaxi onemocnění tuberkulózou <sup>6</sup>.

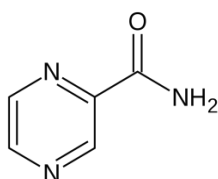
### Ethambutol



Ethambutol inhibuje syntézu metabolitů mykobakterií a tím poškozují jejich metabolismus. Působí pouze na aktivně rostoucí kmeny mykobakterií, zejména *M. tuberculosis*.

Indikací ethambutolu je kombinační léčba plicní tuberkulózy, zejména s isoniazidem a streptomycinem.

### Pyrazinamid



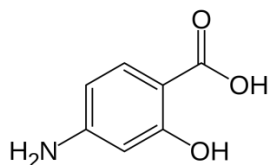
Pyrazinamid je chemoterapeutikum s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem na *M. tuberculosis* v závislosti na koncentraci v místě infekce. Je aktivní při slabě kyselém pH.

Pyrazinamid je v podstatě proléčivo, ze kterého vznikne hydrolýzou uvnitř tuberkulotické buňky aktivní metabolit – kyselina pyrazin-2-karboxylová. Ta inhibicí enzymu FAS I (fatty acid synthetasa) brání syntéze mastných kyselin a tím ovlivňuje membránový potenciál buňky a zasahuje do výroby energie potřebné pro její přežití<sup>11</sup>.

Význam pyrazinamidu spočívá v tom, že jeho nasazení v počátečních fázích léčení (tedy po dobu počátečních 2-3 měsíců) zkracuje nutnou dobu léčební a snižuje četnost recidiv<sup>6</sup>.

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

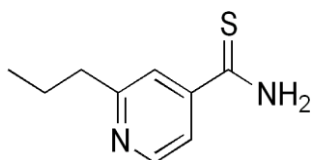
### Kyselina p-aminosalicylová



Kyselina p-aminosalicylová je strukturální analog kyseliny p-aminobenzoové, která se již v současné době v léčbě TBC nepoužívá <sup>7</sup>.

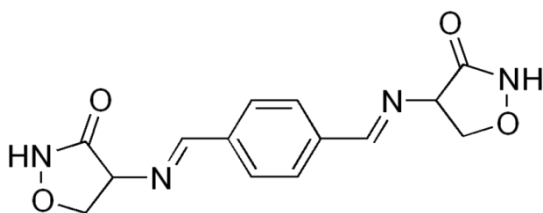
Byla užívána jako první chemoterapeutikum v léčbě TBC. Dnes má status rezervního léčiva. Při jejím podávání je třeba velmi vysokých denních dávek <sup>6</sup>.

### Protionamid



Protionamid je derivát kyseliny izonikotinové. V terapeutických dávkách působí proti *M. tuberculosis* bakteriostaticky. Poměrně rychle se na něj vyvíjí rezistence, jde o rezervní léčivo <sup>6</sup>.

### Terizidon



Terizidon obsahuje v molekule 2 cykloserinové podíly. Tuto látku lze hodnotit jako cykloserin a vzhledem k nežádoucím účinkům na CNS se dá považovat za rezervní léčivo <sup>6</sup>.

### 1.2.2 Vakcinace

V bývalém Československu se zahájilo plošné očkování proti tuberkulóze v roce 1953. V 50. letech se očkovali jak novorozenci, tak starší ročníky, a to pro dosažení rychlé proočkovanosti populace. Od počátku 60. let až do roku 2009 se provádělo očkování novorozenců a starších tuberkulín negativních dětí ve věku 11 let. Výjimkou bylo přechodné období v letech 1986-1994, kdy se ve Středočeském, Východočeském a později i Jihočeském kraji očkovaly děti pouze dobrovolně. Z důvodu rostoucího počtu případů tuberkulózy a úmrtí neočkovaného novorozence se vrátilo plošné očkování i do těchto krajů. Roku 2009 se ukončilo pravidelné přeočkovávání tuberkulín negativních dětí ve věku 11 let.

Očkování proti TBC se v ČR provádělo a ve světě provádí výhradně monovakcínou, kterých existuje několik typů. BCG vakcíny se konstruují jako živé oslabené mykobakteriální vakcíny, avšak obsah vakcinační dávky netvoří jen živé zárodky, ale i mrtvé, a to v důsledku lyofilizace a skladování. Přestože se celosvětově vyrábí několik desítek BCG subkmenů, nejčastěji se používají čtyři: Pasteur-1173 P2, Tokyo-172, Copenhagen-1331 a Glaxo-1077.

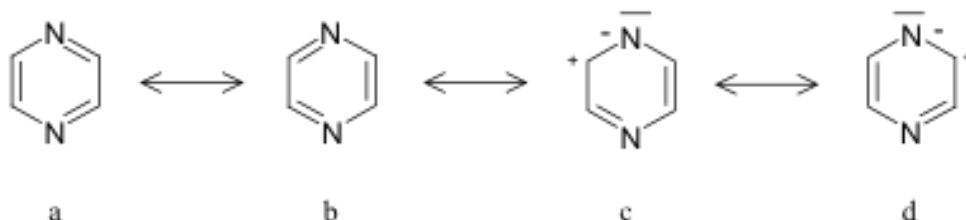
Očkování proti tuberkulóze je určeno výhradně k aktivní imunizaci dětí ve věku od čtyř dní do šesti týdnů, případně starších tuberkulín negativních dětí či dospělých vystavených zvýšenému riziku tuberkulóz<sup>10</sup>.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Pyrazin (1,4-diazin) – vlastnosti

Pyrazin je aromatická heterocyklická sloučenina. Jde o molekulu s vysokou symetrií. Chová jako slabá dvojsytná base (  $pK_1 = 0,57$ ;  $pK_2 = -5,51$ ), v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je ale bazí nejslabší. Svými vlastnostmi se blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů <sup>12,13</sup>.

Pyrazinové jádro je planární útvar, lze ho znázornit jako rezonanční hybrid níže uvedených struktur a-d.



*Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly* <sup>14</sup>

<u>Sloučenina</u>	<u>% aromaticity</u>
Benzen	100
Pyridin	82
Pyridazin	65
Pyrimidin	67
Pyrazin	75

*Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů* <sup>12</sup>

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

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

Porovnáním hustot  $\pi$ -elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu lze konstatovat, že hustota  $\pi$ -elektronů je zvýšená na atomech dusíku, kdežto na uhlíkových atomech je hustota výrazně menší. Hodnoty vypočtené a naměřené se téměř neliší <sup>12</sup>.

Hustoty  $\pi$ -elektronů na  $\alpha$ -uhlících pyrazinu a pyridinu jsou tedy velmi podobné a lze zde očekávat i podobnou chemickou reaktivitu  $\alpha$ -substituovaných pyrazinů a pyridinu.



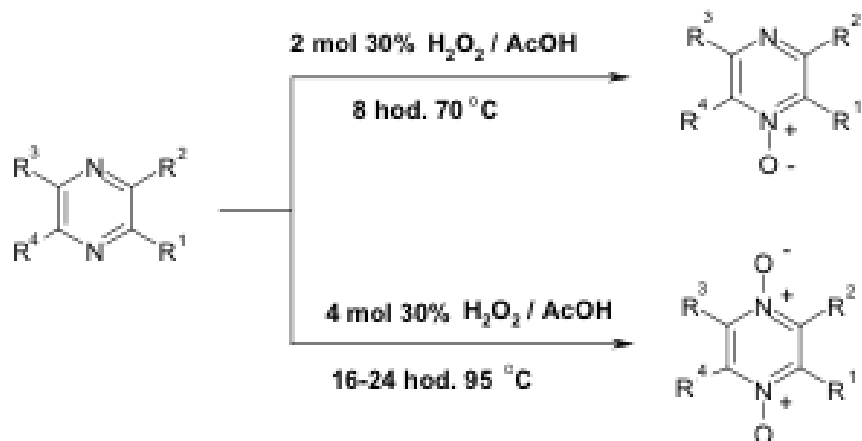
Vzdálenosti atomů pyrazinu a ostatních diazinů jsou sice podobné, ale poloha druhého atomu dusíku značně ovlivňuje geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární a vzdálenost  $C-N$  je 13,48 nm,  $C-C$  pak 13,83 nm. Amidová skupina má však vliv na protažení pyrazinového jádra a úhel sevřený mezi  $N_1$ ,  $\alpha$ - a  $\beta$ - uhlíkem je tedy o 5 ° ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu <sup>12,13</sup>.

### 2.2 Pyrazin (1,4-diazin) – reakce

Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel – Craftsovým aromatickým substitucím, které vedou k přípravě arylalkylketonů. Přímý elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou substituce nukleofilní, zvláště v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na  $N$ -oxid <sup>12</sup>.

Příprava N-oxidů pyrazinu

N-oxidy pyrazinu se nejčastěji připravují pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. Délka zahřívání, teplota a molární koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ovlivňují přechod pyrazinu na 1-mono nebo 1,4-dioxid <sup>14</sup>.



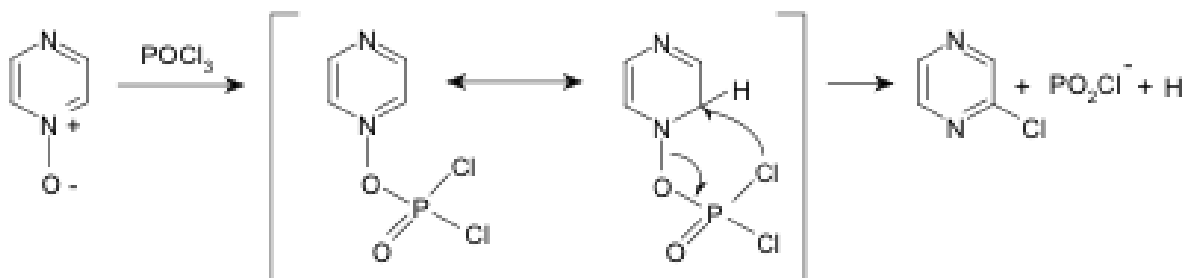
Halogenace pyrazinového jádra

Halogenpyraziny jsou důležitou skupinou derivátů pyrazinu, protože umožňují přípravu velkého množství jinak nedostupných sloučenin díky snadné záměně atomu halogenu za nukleofil.

Halogenderiváty lze připravit třemi klasickými způsoby.

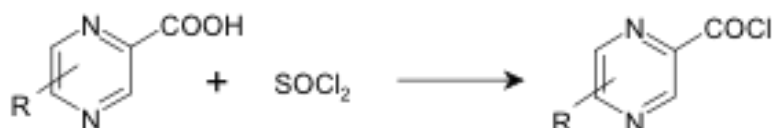
- 1) přímá reakce pyrazinu s halogenem v plynné fázi
- 2) záměna hydroxyly nebo aminoskupiny za halogen působením chloridu či bromidu fosforylu
- 3) nukleofilní halogenace N-oxidu pyrazinu

Poslední zmiňovaná reakce je nejčastější a halogenace takto aktivovaného jádra pyrazin 1-oxidu probíhá nejčastěji do polohy 2, méně častěji pak do polohy 3.



Příprava acylhalogenidů

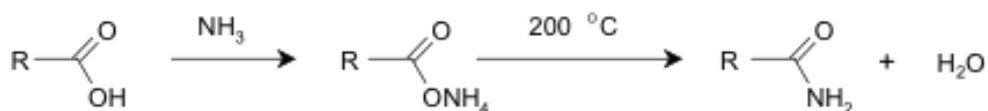
Acylhalogenidy jsou díky své reaktivitě velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Lze je připravit řadou reakcí karboxylových kyselin s halogenidy fosforu, thionylu, fosforylu či sulfurylu. Z hlediska čistoty připravovaných acylhalogenidů je nejvýhodnější použití thionylchloridu (SOCl<sub>2</sub>)<sup>15,16</sup>.



Příprava anlidů karboxylových kyselin

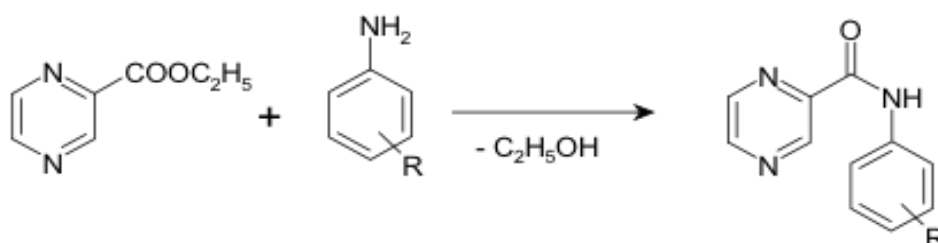
Amidy karboxylových kyselin lze připravit několika způsoby, jednak z kyselin, ale i většiny jejich funkčních derivátů.

Z kyselin se nejčastěji připravují převedením kyseliny na sůl a to s amoniakem nebo primárním či sekundárním aminem. Vzniklá sůl se poté podrobí tepelnému rozkladu (za teploty okolo 200°C). Tímto způsobem lze získat primární, ale i sekundární a terciární amidy<sup>15</sup>.



Další metodou pro získání amidu je aminolýza funkčního derivátu karboxylové kyseliny. Nejčastěji jde o aminolýzu esterů nebo acylhalogenidů, zejména chloridů (aminolýza samotné karboxylové kyseliny má pro laboratorní přípravu anlidů malý význam).

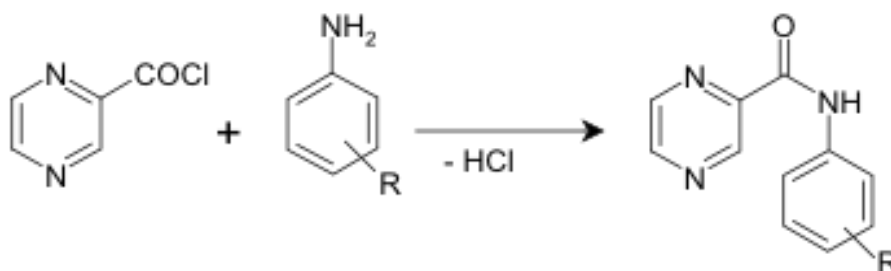
Aminolýza esterů je výhodnou cestou přípravy, která se zpravidla provádí při zvýšené teplotě zahříváním směsi esteru a amoniaku (resp. aminu) až k varu. Rovnováha reakce směrem k amidu je posouvána oddestilováním volného alkoholu.





## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

K přípravě anlidů pyrazinkarboxylové kyseliny se nejčastěji používá aminolýza chloridu kyseliny, která probíhá ve většině případů za velmi příznivých podmínek. Důležitou podmínkou pro tuto reakci je přidání akceptoru protonů uvolněné kyseliny do reakční směsi. Využívá se hlavně pyridin, ale lze použít i jiný terciární amin. Bez akceptoru protonů by uvolněný chlorovodík vyvázal 1 mol aminu a ke vzniku anlidu by nedošlo <sup>16</sup>.



### 3 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Modifikace struktury pyrazinamidu je od konce 50.let nosným programem řady laboratoří. Různé týmy vědců po celém světě se snaží připravit perspektivní látky typu jednoduchých chlorovaných derivátů charakteru prolečiv - hlavně estery a amidy.

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě věnuje studiu pyrazinu a syntéze jeho derivátů s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem.

Moje diplomová práce je tak jednou z řady dílčích prací a výzkumných aktivit této katedry.

Mým cílem při tvorbě této diplomové práce bylo připravit deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny, které budou vykazovat biologickou, tj. antifungální a hlavně antimykobakteriální aktivitu.

Těžiště práce:

1. Rešerše zaměřená především na současný význam tuberkulózy ve světě, novodobá terapie a nová potenciální antituberkulotika.
2. Metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Příprava substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny, které nebyly dosud v literatuře popsány.
4. Výpočet log *P* nově připravených derivátů.
5. Pokusit se najít vztah mezi strukturou a účinkem připravených látek.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Přístroje a chemikálie

Do níže uvedených reakcí byly použity chemikálie s ověřenými fyzikálními konstantami, rozpouštědla byla před použitím vysušena a čištěna.

Všechny připravené látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím. Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie s použitím desek Merck, Silica gel 60 F<sub>254</sub>. Byla použita vyvíjecí soustava hexan – ethyl-acetát (1:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Teploty tání byly stanoveny v kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP3, Bibby Sterling LTD, UK a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla naměřena pomocí FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Nicolet - Thermo Scientific, USA) v KBr, měření provedla p. Iva Vencovská z KAOCH FaF UK.

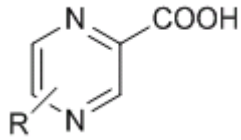
<sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pro <sup>1</sup>H a 75,43 MHz pro <sup>13</sup>C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, Csc. z KAOCH FaF UK. Chemické postupy jsou vztaženy k Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.

Log *P* sloučenin byl vypočten programem CS ChemBioOffice Ultra, verze 11.0 (CambridgeSoft. Cambridge, MA, USA).

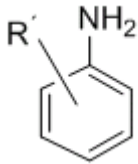
## 4.2 Schémata prováděných reakcí

### 4.2.1 Výchozí látky

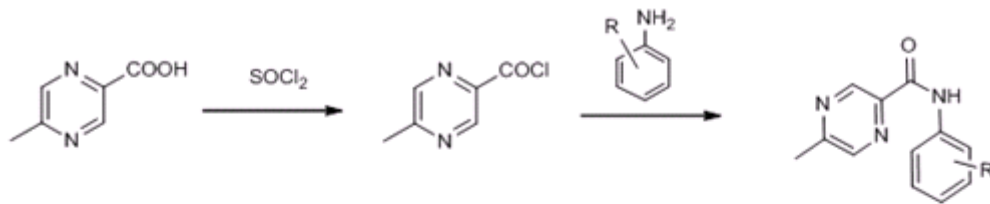
Substituovaná a nesubstituovaná pyrazin-2-karboxylová kyselina (Sigma Aldrich)



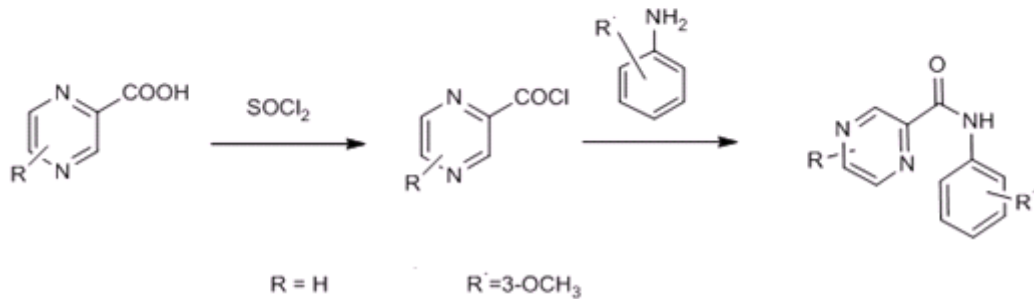
Substituovaný anilin (Sigma Aldrich)



### 4.2.2 Příprava vlastních anilidů



R = 3-I-4-CH<sub>3</sub>, 5-F-2-CH<sub>3</sub>, H, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2-Br-5-CF<sub>3</sub>

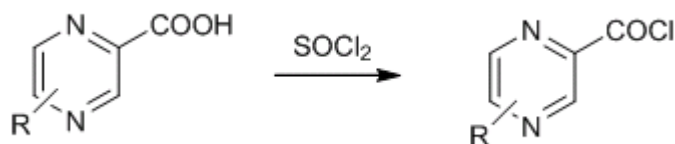


R = H

R' = 3-OCH<sub>3</sub>

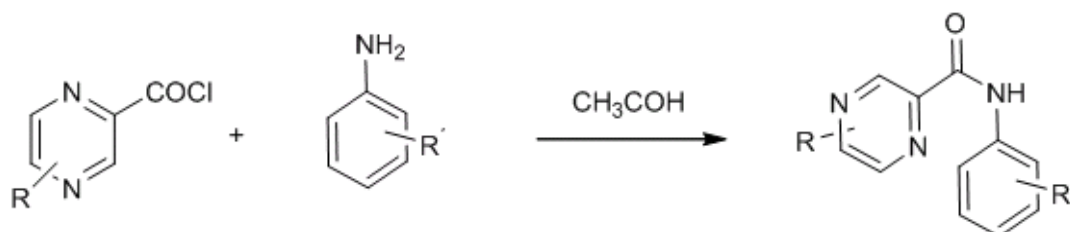
### 4.3 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

#### 4.3.1 Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny



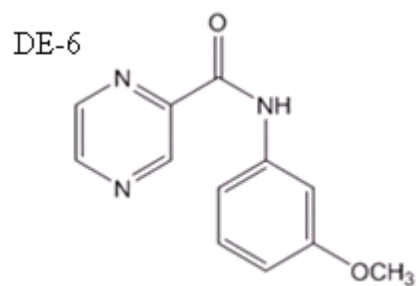
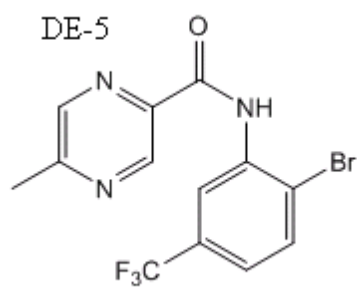
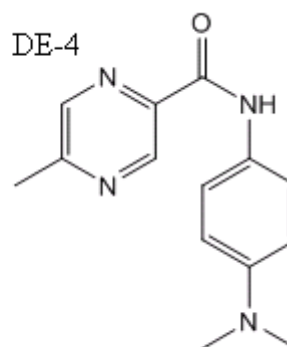
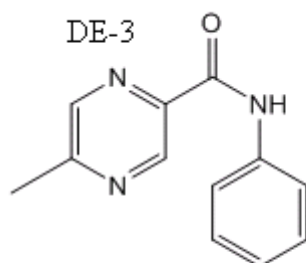
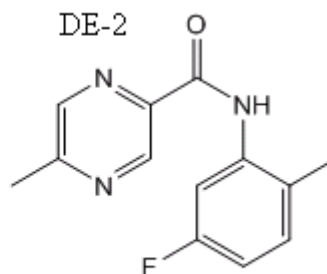
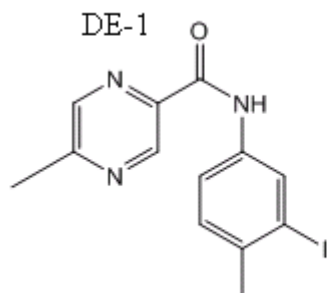
0,001 mol substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustí ve 20 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka je opatřena zpětným chladičem s uzávěrem proti vniknutí vzdušné vlhkosti. K roztoku se přidá 0,01 mol thionylchloridu a zahřívá se pod zpětným chladičem k varu při teplotě 111 °C asi 45 min. Poté se nezreagovaný podíl thionylchloridu oddestiluje za sníženého tlaku na vakuové odparce. Na závěr se přidá malé množství toluenu pro azeotropní oddestilování zbytku thionylchloridu z produktu. Surový produkt se dále nečistí a použije do další reakce.

#### 4.3.2 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

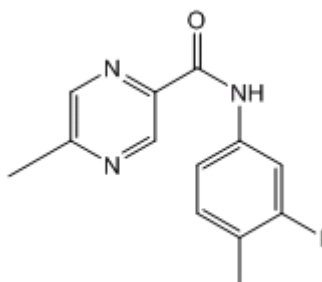


V bezvodém acetonu se rozpustí 0,001 mol substituovaného anilinu v Erlenmayerově baňce opatřené míchadlem. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce se přikape roztok chloridu substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém acetonu a pyridin. Směs se míchá asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté se aceton oddestiluje za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce a surový produkt se překrystalizuje ze směsi voda:ethanol. Provede se kontrola průběhu reakce pomocí TLC v soustavě aceton:toluen (1:1) a změří se teplota tání získaného produktu.

#### 4.4 Připravené sloučeniny a jejich charakteristiky

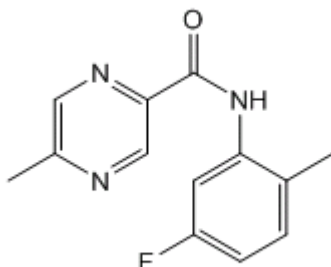


## 4.4.1 N-(3-jod-4-methylfenyl)-5-methyl pyrazin-2-karboxamid



Název	N-(3-jod-4-methylfenyl)-5-methyl pyrazin-2-karboxamid
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> IN <sub>3</sub> O
Označení	DE-1
Výchozí látky	
Molekulová hmotnost	353,16
Log P	3,14
Elementární analýza [%]	Vypočteno: C 44,21; H 3,42; I 35,93; N 11,90; O 4,53 Naměřeno: C 44,30 %, H 3,34 %, N 11,77 %
Výtěžek reakce[mg]	130
Výtěžnost [%]	37
Teplota tání [°C]	152,6-157,6
R <sub>f</sub>	0,81
<sup>1</sup> H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]	10.69 (1H, bs, NH), 9.13 (1H, d, J=1.2 Hz, H3), 8.67 (1H, d, J=1.2 Hz, H6), 8.46 (1H, d, J=2.1 Hz, H2'), 7.80 (1H, dd, J=8.2 Hz, J=2.1 Hz, H6'), 7.29 (1H, d, J=8.2 Hz, H5'), 2.62 (3H, s, CH <sub>3</sub> ), 2.33 (3H, s, CH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]	162.0, 157.4, 143.2, 142.9, 142.3, 137.3, 136.4, 130.1, 129.7, 120.6, 100.8, 27.0, 21.6
IČ spektrum (KBr), [cm <sup>-1</sup> ]	3338 (NH), 2924 (methyl), 2856 (methyl), 1695 (C=O), 1600 (fenyl), 1508 (NH), 1372, 1286, 1174, 1028 (pyrazin)

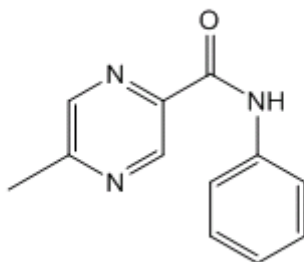
## 4.4.2 N-(5-fluor-2-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid



Název	N-(5-fluor-2-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O
Označení	DE-2
Výchozí látky	
Molekulová hmotnost	245,25
Log P	1,94
Elementární analýza [%]	Vypočteno: C 63,66; H 4,93; F 7,75; N 17,13; O 6,52 Naměřeno: nebylo změřeno
Výtěžek reakce[mg]	140
Výtěžnost [%]	57
Teplota tání [°C]	142,2-143,0
R <sub>f</sub>	0,86
<sup>1</sup> H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]	10.96 (1H, bs, NH), 9.11 (1H, s, H3), 8.59 (1H, s, H6), 8.18 (1H, m, H5'), 7.65 (1H, m, H3'), 7.50 (1H, m, H4'), 2.58 (3H, s, CH <sub>3</sub> ), 2.38 (3H, s, CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]	163.3, 162.0, 156.2, 153.8, 144.1, 142.2, 137.7, 129.8, 118.1, 117.9, 116.3, 26.9, 20.9.
IČ spektrum (KBr), [cm <sup>-1</sup> ]	3351 (NH), 2929, 2915 (methyl), 1677 (C=O), 1601 (fenyl), 1531 (NH), 1267, 1151, 1027 (pyrazin).

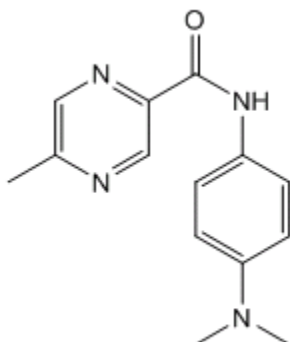


## 4.4.3 5-methyl-N-fenylpyrazin-2-karboxamid



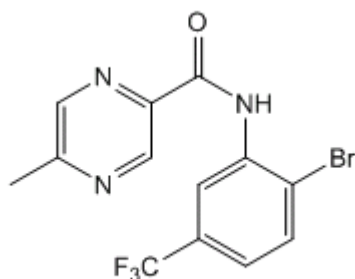
Název	5-methyl-N-fenylpyrazin-2-karboxamid
Sumární vzorec	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O
Označení	DE-3
Výchozí látky	
Molekulová hmotnost	213,24
Log P	1,29
Elementární analýza [%]	Vypočteno: C 67,59; H 5,20; N 19,71; O 7,50 Naměřeno: nebylo změřeno
Výtěžek reakce[mg]	43
Výtěžnost [%]	19
Teplota tání [°C]	147,4-150,4
R <sub>f</sub>	0,78
<sup>1</sup> H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]	11.01 (1H, bs, NH), 9.16 (1H, d, J=1.2 Hz, H3), 8.70 (1H, s, H6), 7.67-7.16 (5H, m, arom.), 2.62 (3H, s, CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]	162.6, 157.7, 143.3, 142.1, 139.3, 130.0, 129.6, 127.7, 124.3, 120.5, 116.9, 21.6.
IČ spektrum (KBr), [cm <sup>-1</sup> ]	nebylo změřeno

## 4.4.4 N-[4-(dimethylamino)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid



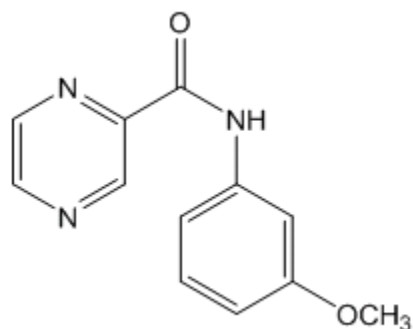
<b>Název</b>	N-[4-(dimethylamino)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid
<b>Sumární vzorec</b>	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O
<b>Označení</b>	DE-4
<b>Výchozí látky</b>	
<b>Molekulová hmotnost</b>	256,30
<b>Log P</b>	1,58
<b>Elementární analýza [%]</b>	Vypočteno: C 65,61; H 6,29; N 21,86; O 6,24 Naměřeno: C 65,48; H 5,98; N 21,43
<b>Výtěžek reakce[mg]</b>	97
<b>Výtěžnost [%]</b>	38
<b>Teplota tání [°C]</b>	179,5-183,0
<b>R<sub>f</sub></b>	0,72
<b><sup>1</sup>H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]</b>	10.37 (1H, bs, NH), 9.11 (1H, s, H3), 8.65 (1H, s, H6), 7.73-7.64 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.75-6.68 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.86 (6H, s, NCH <sub>3</sub> ), 2.60 (3H, s, CH <sub>3</sub> ).
<b><sup>13</sup>C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]</b>	161.1, 157.0, 147.7, 143.0, 142.8, 128.1, 121.9, 112.6, 40.6, 21.6.
<b>IČ spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]</b>	3356 (NH), 2971 (methyl), 1683 (C=O), 1606 (fenyl), 1508 (NH), 1354, 1264, 1164, 1130 (pyrazin)

## 4.4.5 N-[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid



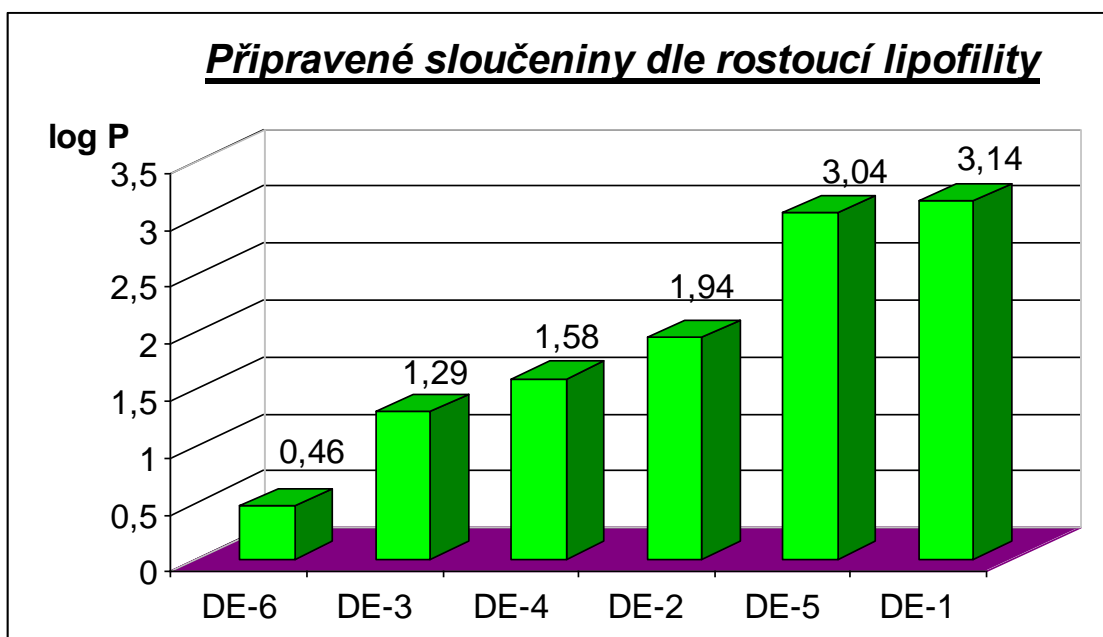
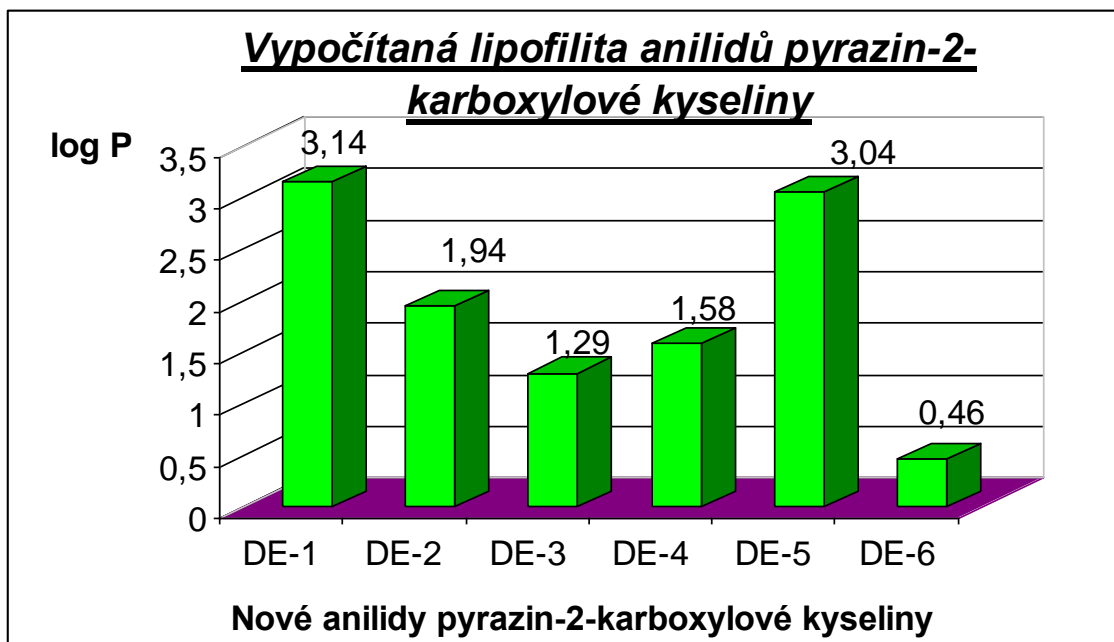
Název	N-[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> BrF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O
Označení	DE-5
Výchozí látky	
Molekulová hmotnost	360,13
Log P	3,04
Elementární analýza [%]	Vypočteno: C 43,36; H 2,52; Br 22,19; F 15,83; N 11,67; O 4,44 Naměřeno: nebylo změřeno
Výtěžek reakce[mg]	80,6
Výtěžnost [%]	22
Teplota tání [°C]	179,5-181
R <sub>f</sub>	0,9
<sup>1</sup> H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]	10.35 (1H, bs, NH), 9.09 (1H, s, H3), 8.70 (1H, s, H6), 7.98-7.94 (2H, m, H6'), 7.55-7.53 (1H, m, H3', H4'), 2.48 (3H, s, CH <sub>3</sub> ).
<sup>13</sup> C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]	161.82, 158.57, 143.32, 143.13, 142.96, 140.90, 136.53, 134.15, 129.41, 128.97, 122.91, 119.32, 21.77.
IČ spektrum (KBr), [cm <sup>-1</sup> ]	3353 (NH), 2924 (methyl), 1695 (C=O), 1617 (fenyl), 1513 (NH), 1281, 1127, 1033 (pyrazin)

## 4.4.6 N-(3-methoxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid



Název	N-(3-methoxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid
Sumární vzorec	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
Označení	DE-6
Výchozí látky	
Molekulová hmotnost	229,23
Log P	0,46
Elementární analýza [%]	Vypočteno: C 62,87; H 4,84; N 18,33; O 13,96 Naměřeno: nebylo změřeno
Výtěžek reakce[mg]	120
Výtěžnost [%]	52
Teplota tání [°C]	99-104
R <sub>f</sub>	0,80
<sup>1</sup> H NMR(300 MHz, DMSO), [δ]	10.63 (1H, bs, NH), 9.26 (1H, s, H3), 8.95 (1H, s, H6), 7.60-7.48 (2H, m, H2', H6'), 7.28-7.20 (2H, m, H4', H5'), 2.60 (3H, s, OCH <sub>3</sub> )
<sup>13</sup> C NMR(75 MHz, DMSO), [δ]	161.86, 159,64, 147,92, 145.20, 144.25, 143.39, 139,52, 129,69, 112.87, 109.98, 106.42, 55.24.
IČ spektrum (KBr), [cm <sup>-1</sup> ]	3351 (NH), 2942 (OCH <sub>3</sub> ), 1683 (C=O), 1606 (fenyl), 1510 (NH), 1400, 1321, 1166, 1044 (pyrazin).

#### 4.5 Vypočítaná hodnota log P připravených látek



## 5 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

### 5.1 Antituberkulotická aktivita, TAACF

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (*Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility*). Program TAACF se skládá ze tří úzce propojených součástí :

1. příjem a uchovávání sloučenin (Southern Research Institute, Frederik, USA )
2. *in vitro* screening (Hansen´s Diseases Center)
3. *in vivo* screening (Colorado State University)

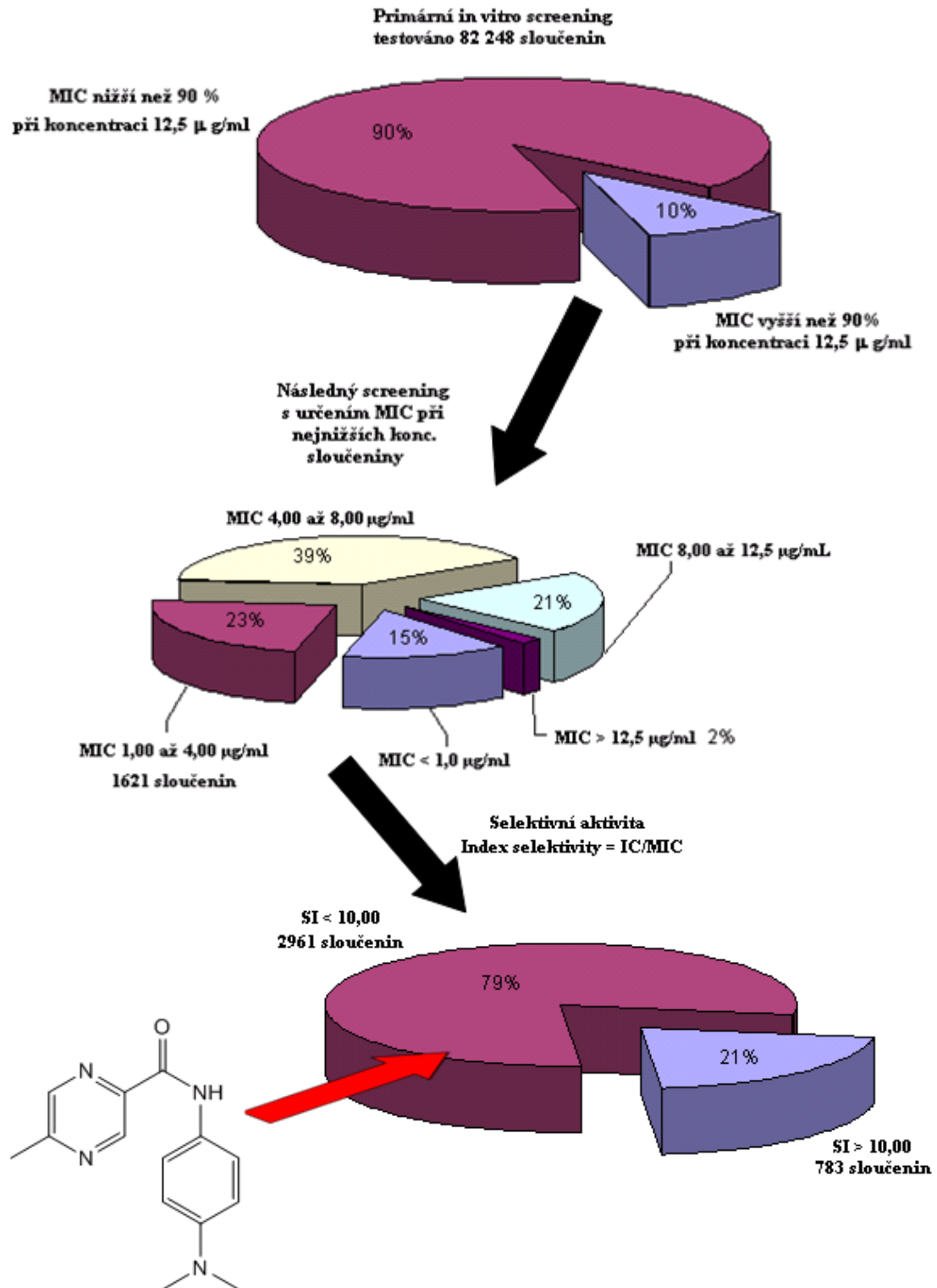
Primární *in vitro* screening se provádí proti *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv v mediu BACTEC 12B použitím BACTEC 460 radiometrického systému<sup>17,18</sup>.

Látky, které mají v primárním screeningu inhibici vyšší než 90% projdou do další fáze testování při nižších koncentracích. Určuje se zde přesná MIC v mikrodilučním Alamar blue testu (MABA). V případě zjištění dostatečné aktivity (jako standard MIC se počítá koncentrace látky 1,00 - 4,00 µg/ml ) následuje další testování sloučenin na cytotoxicitu. Látky s nejnižší cytotoxicitou jsou dále testovány *in vivo*.

Celkem již bylo otestováno přes 82 tisíc sloučenin. Antituberkulotickou aktivitu s inhibicí vyšší než 90% mělo 10 % ze zkoušených látek. Do druhého kola testování se tedy dostalo 8 063 látek. MIC v MABA testu od 1,00 do 4,00 µg/ml mělo pouze 1621 sloučenin. Testy cytotoxicity zúžily skupinu potencionálních antituberkulotik na pouhých 783.

Jako aktivní sloučenina byla vyhodnocena látka DE-4 s IC<sub>50</sub> 2,125µg/ml.

## Průběh projektu TAACF



## **5.2 Antimykotická aktivita**

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly podrobeny testování *in vitro* na antifungální aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové. Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodilučního bujónového testu. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v médiu RPMI 1640 s glutaminem, roztok byl pufován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS. Součástí testování byly slepé pokusy (bez účinné látky). MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Inkubace probíhala staticky, ve tmě a v humidní atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

Testovné kmeny (kód, číslo) :

*Candida albicans* ATCC 44859

*Candida tropicalis* 156

*Candida krusei* E28

*Candida glabrata* 20/I

*Trichosporon asahii* 1188

*Aspergillus fumigatus* 231

*Absidia corymbifera* 272

*Trichophyton mentagrophytes* 445



### **5.3 Antibakteriální aktivita**

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly dále podrobeny testům *in vitro* na antibakteriální aktivitu (též na KBLV FaF HK). Antibakteriální aktivita všech sloučenin byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou.<sup>22</sup>

Mikroorganismy, na nichž testování probíhalo pocházejí z kmenů České sbírky mikroorganismů (Brno, ČR) Tyto kmeny jsou doporučovány jako normy pro testování antibakteriálních aktivit. Jedná se o :

***Staphylococcus aureus CCM 4516/08 – SA***

***Escherichia coli CCM 4517 – EC***

***Pseudomonas aeruginosa CCM 1961 - PA.***

Ostatní kmeny byly klinicky izolované (Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v HK, Univerzita Karlova v Praze):

***Staphylococcus aureus H 5996/08 - methicilin odolné – MRSA***

***Staphylococcus epidermidis H 6966/08 – SE***

***Enterococcus sp. J 14365/08 – EF***

***Klebsiella pneumoniae D11750/08 - KP,***

***Klebsiella pneumoniae J 14368/08 - ESBL pozitivní - KP-E.***

Všechny kmeny byly naočkovány na Mueller-Hintonův agar (MHA) (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při 35 ° C a udržovaly se na stejném médiu při teplotě 4 °C. Před testováním byl každý kmen pasážován. Bakteriální inokula byla připravena ve sterilním 0,85% fyziologickém roztoku. Buněčná hustota inokula byla upravena s použitím denzitometrie k získání suspenze o hustotě odpovídající 0,5 McFarlandovy stupnice, což odpovídá  $1,5 \times 10^8$  životaschopné kolonie v 1 ml.

Sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO. Kontrolou testování byly slepé pokusy, jež se skládaly pouze z média a DMSO. Konečná koncentrace DMSO ve zkušebním médiu neměla překročit 1% (v / v). MIC se odečítala ve srovnání s kontrolou po 24 a 48 hod inkubace, která probíhala při teplotě 35 °C staticky, ve tmě a v humidní atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

## 6 DISKUZE

V úvodní části této diplomové práce jsem se snažila nastínit současnou problematiku onemocnění TBC. Uvedená terapie je aktuální, avšak z hlediska rezistence, multirezistence a totální rezistence na uváděná léčiva je snaha řady laboratoří rozšířit skupinu antituberkulotik, aby byla terapie v dalších letech dostačující.

Tato diplomová práce je další z řady děl pod Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv FaF v HK, jež je zaměřená na přípravu sloučenin ze skupiny anilidů substituované pyrazinkarboxylové kyseliny. V minulosti bylo připraveno několik sérií látek tohoto typu<sup>23,24,25</sup>, s různě substituovaným aromatickým jádrem.

Nejčastějšími substituenty byly :

- kyselá fenolická skupina
- halogeny
- alkyly
- alkoxykupiny

Celkem bylo připraveno 6 látek. Jedná se o anilidy 5-methylpyrazin-2-karboxylové kyseliny a substituovaný anilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

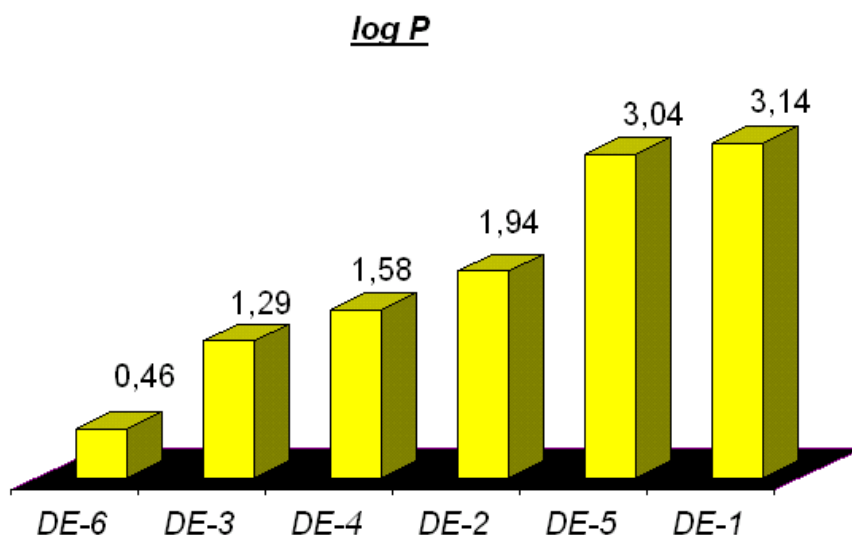
Látky byly připraveny reakcí chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny s příslušnými aniliny (viz. Experimentální část).

Reakce probíhaly většinou bez problémů, nižší výtěžky jsem pozorovala u produktů, které vznikly z anilinů tekutého skupenství. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 19 – 57 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu.

Finální látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spektry, popř. i elementární analýzou. Čištění látek jsem prováděla rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

Dále byly u látek zjištěny hodnoty lipofility  $\log P$  a  $\text{ClogP}$  pomocí programu CS ChemOffice Ultra, verze 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Hodnota  $\log P$  je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě n-oktanol/voda. Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí  $\log P -0,46 - 3,14$ .



Dostatečná lipofilita je jednou z důležitých a základních podmínek pro průnik přes vysoce lipofilní mykobakteriální stěnu. Ve většině případů lipofilita stoupá s molekulovou hmotností. Lipofilnější sloučeniny jsou logicky ty, které jsou substituovány lipofilním substituentem, konkrétně : bromem, fluorem, jodem.

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

V rámci celosvětového testování TAACF byly odeslány všechny látky k zjištění antimykobakteriální aktivity. Vyhodnocení jejich aktivity je v době odevzdání této práce známo u třech z nich : DE-3, DE-4, DE-5. Jako aktivní byla vyhodnocena látka DE-4 s  $IC_{50}$  2,125 $\mu$ g/ml. Jediná byla zkoušena na cytotoxicitu. Bohužel index selektivity SI nepřekročil dolní hranici 10 – konkrétně byla jeho hodnota 5,8365, proto další testování *in vivo* nebylo možné. Slabou aktivitou se vyznačují látky DE-3 a DE-5.  $IC_{50}$  shrnuje následující tabulka :

	IC 50 ( $\mu$ g/ml)	Aktivita	log P
DE-3	9,824	slabě aktivní	1,29
DE-4	2,125	<b>aktivní</b>	1,58
DE-5	7,156	slabě aktivní	3,04

Všechny látky byly podrobeny testování na antimykotickou aktivitu. Bohužel ani jedna z látek nevykazovala MIC 80 %.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> ( $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )					
		DE-2	DE-1	DE-6	DE-5	DE-3	DE-4
CA	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
CT	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
CK	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
CG	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
TB	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
AF	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
AC	24h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>250	>500
TM	72h	>250	>125	<b>500</b>	>125	>250	>500
	120h	>250	>125	>500	>125	>250	>500

## Deriváty pyrazinu jako potencionální léčiva I.

Dále byly všechny látky podrobeny testům na antibakteriální aktivitu. Ani zde nebyla aktivita prokázána.

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC <sub>80</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )					
		DE-2	DE-1	DE-6	DE-5	DE-3	DE-4
SA	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
MRSA	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
SE	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
EF	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
EC	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
KP	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
KP-E	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
PA	24h	>250	>125	>500	>125	>500	>500
	48h	>250	>125	>500	>125	>500	>500

Ze získaných dat nelze určit vztah mezi strukturou, biologickým účinkem a lipofilitou.

## ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsem plnila následující úkoly:

1. V odborné literatuře a na internetu jsem vyhledala podklady pro následnou rešerši zaměřenou na význam tuberkulózy ve světě a současné přístupy k její terapii a eradikaci.
2. S použitím dostupné chemické literatury jsem zjistila metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravila jsem šest v literatuře dosud nepopsaných sloučenin:

N-(3-jod-4-methylfenyl)-5-methyl pyrazin-2-karboxamid

N-(5-fluor-2-methylfenyl)-5-methylpyrazin-2-karboxamid

5-methyl-N-fenylpyrazin-2-karboxamid

N-[4-(dimethylamino)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid

N-[2-brom-5-(trifluormethyl)fenyl]-5-methylpyrazin-2-karboxamid

N-(3-methoxyfenyl)pyrazin-2-karboxamid

4. Tyto látky jsem zvážila a odeslala na *in vitro* biologické testy – antituberkulotické a antimykotické. Získala jsem údaje o antituberkulotické a antimykotické aktivitě pouze u některých látek, testy TAACF byly ukončeny 26. srpna 2009, sloučeniny připravené po tomto datu již nebyly k určení antituberkulotické aktivity odeslány.
5. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log P nově připravených látek.
6. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (viz. Diskuze).

## LITERATURA

- <sup>1</sup> PEŘINOVÁ, J., *Tuberkulóza, Solutio* [online] 2000/2001., on-line : <http://www.medon-solutio.cz/> Dostupný z WWW: [http://www.medon-solutio.cz/main.php?clanek=107132&rok=2001&e=&akce=1&nl=1&right=zobraz\\_text.php&left=left.php&bottom=obsah.php](http://www.medon-solutio.cz/main.php?clanek=107132&rok=2001&e=&akce=1&nl=1&right=zobraz_text.php&left=left.php&bottom=obsah.php).
- <sup>2</sup> BÁRTŮ, V., *Tuberkulóza ve světle 21.století*, . Medical Tribune [online]. 2010, č.4 [cit. 2010-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.tribune.cz/clanek/16880>.
- <sup>3</sup> MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. Praha : Grada, 2004, 1.vyd., 347 s.
- <sup>4</sup> [www.zdravcentra.cz](http://www.zdravcentra.cz)[online].[cit.2010-04-30]. Dostupný z WWW: <http://www.zdravcentra.cz/index.php?act=bq-31&aid=2&oid=156&off=&dir=&ord=>.
- <sup>5</sup> TRIPANTI, R., P., TEWARI, N., DWIVENDI, N., TIWARI, V., K., *Fighting Tuberculosis: An Old Disease with New Challenges*, Medicinal Research Reviews, 2005, p.93-131.
- <sup>6</sup> LULLMAN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vydání. Praha : Grada, 2002, 694 s.
- <sup>7</sup> LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha : Galén, Karolinum, 2005, 1. vyd., 601 s.
- <sup>8</sup> HOMOLKA, J. VOTAVA, V.; *Tuberkulóza*. Praha : Karolinum, 2003, 3.vyd., 79 s.
- <sup>9</sup> FENDRICH, Z., *Antituberkulotika*. Farmakologie - přednáška. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové, 2008.
- <sup>10</sup> PETRÁŠ, M., LESNÁ, I., K. *Manuál očkování 2010*, 3.vydání, leden 2010 Marek Petráš, pp 311-332 Dostupný z WWW: [http://www.vakciny.net/doporucene\\_ockovani/tbe.html](http://www.vakciny.net/doporucene_ockovani/tbe.html).
- <sup>11</sup> ZIMHONY, O., VILCHEZE, C., ARAI, M. et al. Antimicrob Agents Chemother. *Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli*. 2007, vol. 51 Issue: 2, p. 752-754.
- <sup>12</sup> PRATT, Y. T.: The Pyrazines and Piperazines. In : Elderfield R. C.: *Heterocyclic Compounds*. 1957, vol. 6., J. p.377.
- <sup>13</sup> A. F. POŽARSKIJ, *Chim. Geterocikl. Soedin.*, 1987, vol. 7, p. 867.

- <sup>14</sup> KLEIN, B., HETMAN, N., E., O'DONNELL, M., E., *Pyrazines. III. The Action of Phosphoroyl Chloride on Pyrazine N-Oxides*. Jour. Org. Chem., vol. 28, Issue:6, p. 1682-1686, 1963.
- <sup>15</sup> HRABÁLEK, A., a kol., *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, 1999, 1.vyd., 162 s.
- <sup>16</sup> ČERVINKA, O., a kol., *Chemie organických sloučenin, 2. díl*, 1. vydání. SNTL/ALFA, 1987, 1.vyd., 1052 s.
- <sup>17</sup> KRÁĽOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F., SIDOVÁ, E., *Photosynthesis inhibition produced by 2-alkylthio-6-r-benzothiazoles*. Chem.Pap., 1992, vol. 46 Issue: 5, p. 348-350.
- <sup>18</sup> DOLEŽAL, M., VIČÍK, R., MILETÍN, M., KRÁĽOVÁ, K. *Synthesis and antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting evaluation of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids*. Chem.Pap. 2000, vol. 54, p. 245-248.
- <sup>19</sup> COLLINS, L. A. and FRANZBLAU, S. G. *Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium*. Antimicrob. Agents Chemother. 1997, vol. 41, p. 1004-1009.
- <sup>20</sup> DOLEŽAL, M., HARTL, J., MILETIN, M., *Antimycobacterial evaluation of some anilides of pyrazine-2-carboxylic acid*. Folia Pharm.Univ.Carol, 2000, Vol. 25, p. 15-19.
- <sup>21</sup> DOLEŽAL, M., ČMEDLOVÁ, P., PALEK, L., VINŠOVÁ, J., KUNEŠ, J., BUCHTA, V., JAMPÍLEK, J., and KRÁĽOVÁ, K. *Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides*. Eur.J.Med. Chem., 2007, Vol. 341 no. 1, p. 61-65.
- <sup>22</sup> JONES, R., N., BARRY, A., L. *Optimal dilution susceptibly testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination*. Journal of Clinical Microbiology, 1987, vol. 25, p. 1920-1925.
- <sup>23</sup> DOLEŽAL, M., HARTL, J., MILETIN, M., et al., Chem. Pap., 1999, vol. 53, p. 126.
- <sup>24</sup> DOLEŽAL, M., MILETÍN, M., HARTL, J., KRÁĽOVÁ, K., KUNEŠ, J., *Synthesis of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids and their photosynthesis-inhibiting activity*. 4th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4), [online], 2000, p. 1-30.
- <sup>25</sup> DOLEŽAL, M., KRÁĽOVÁ, K., ŠERŠEŇ, F., MILETÍN, M., *The Site of Action of Some Anilides of Pyrazine-2-Carboxylic Acids in the Photosynthesis Apparatus*. Folia Pharm. Univ. Carol., [online], 2001, vol. 26, p. 13 – 20.