UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce

DERIVÁTY PYRAZINU JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA III.

Hradec Králové, 2009 **Anna Hošťálková**

PODĚKOVÁNÍ

Velmi děkuji vedoucímu diplomové práce **doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.** Za odborné vedení a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Hradci Králové dne 14.5.2009 .....

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

….....

Abstrakt

Deriváty pyrazinu jako potanciální léčiva III.

Tuberkulóza je problém v celosvětovém měřítku. Rostoucí počet nakažených lidí, vznik lékově rezistentních kmenů *Mycobacterium tuberculosis* a ko-infekce HIV vedly k naléhavé potřebě nových antituberkulotik. Tato diplomová práce referuje o současných léčivech používaných při léčbě tuberkulózy a některých nových potenciálních antituberkuloticích. Také bylo v rámci diplomové práce syntetizováno deset nových látek, derivátů anilidů kyseliny pyrazin-2-karboxylové, které byly charakterizovány jejich fyzikálními vlastnostmi a poté byla zkoušena jejich antimykobakteriální a antifungální aktivita *in vitro*.

Abstract

Pyrazine derivatives as potential drugs III.

Tuberculosis is a health problem worldwide. The increasing number of infected people, emergence of drug resistant strains *Mycobacterium tuberculosis* and HIV co-infection have resulted in the urgent need for new antituberculosis drugs. This degree work reviews drugs used in current treatment for tuberculosis and some of new potential anti-tuberculosis drug candidates. Within the task of this work were also synthesized ten new compounds, derivatives of anilides of pyrazin-2-carboxylic acid, which were characterized by physical properties and then was assayed their antimycobacterial and antifungal activity *in vitro*.

Obsah

1 Cíl diplomové práce 6
2 Úvodní část 7
2.1 Tuberkulóza a její léčba 7
2.2 Antituberkulotika první volby 9
2.3 Antituberkulotika druhé volby 16
2.4 Potenciální léčiva 19
2.5 Perspektivy dalšího vývoje 27
3 Teoretická část 28
3.1 Vlastnosti pyrazinového jádra 28
3.2 Příprava acylhalogenidů 29
3.3 Příprava anilidů karboxylových kyselin 29
4 Experimentální část 30
4.1 Přístroje a chemikálie 30
4.2 Výchozí struktury 31
4.3.Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny 32
4.3.1 Příprava chloridů pyrazin-2-karboxylové kyseliny 32
4.3.2 Příprava anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny 32
5 Výsledky 33
5.1 Charakteristiky připravených derivátů pyrazinu 33
5.2 Log P, Clog P, log K 38
5.3 Antimykotická aktivita 39
6 Diskuze 40
7 Závěr 42
8 Literatura 43

1 Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce byla snaha připravit biologicky (tj. antifungálně a především antimykobakteriálně) aktivní deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny.

Konkrétními úkoly bylo:

- Provést literární rešerši zaměřenou především na potenciální antituberkulotika.
- Připravit substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny, ve kterých je připojený aromatický kruh v různých polohách substituován různými substituenty.
- Posoudit vztah mezi strukturou, biologickým účinkem (antituberkulózní, antimykotická) a lipofilitou v sérii připravených látek.

Tato diplomová práce je dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

2 Úvodní část

2.1 Tuberkulóza a její léčba

Tuberkulóza je infekční onemocnění šířené vzduchem. Častými příznaky bývají přetrvávající kašel, bolest na hrudníku, hemoptýza (vykašlávání krve), teplota, zimnice, noční pocení, ztráta chuti k jídlu, ztráta tělesné váhy a únavnost. Tuberkulóza většinou napadá plíce, avšak ve 25% případů baktérie proniká do krevního řečiště a napadá jiné části těla jako pleura (pohrudnice), mozkové pleny, lymfatická či urogenitální systém, kosti a klouby [1,2].

Naprostá většina infekcí tuberkulózy je způsobena kmenem *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*), ale jiné blízce příbuzné kmeny mykobakterií mohou taktéž způsobit onemocnění. *M. tb.* je acidorezistentní obligátně aerobní bacil, dělící se velmi malou rychostí. Chemické složení buněčných stěn zahrnuje peptidoglykany a komplexní lipidy, speciální mykolové kyseliny, které význačně podmiňují virulenci tohoto kmene. Jedinečná struktura buněčných stěn *M. tb.* umožňuje uložit se do dormantní podoby na mnoho let jako latentní infekce, částečně protože může snadno růst uvnitř makrofágů, ukrytý před imunitním systémem hostitele [1].

Za návrat tuberkulózy jsou zodpovědné faktory jako lidé nakažení HIV, migrace obyvatel, válka, hladomor, bezdomovectví, nedostatek nových léků a nedokončená či přerušovaná léčba vedoucí k vzniku kmenů rezistentních na současná léčiva. Proto jsou nejvíce postiženi lidé ve vývojových zemích, ale výskyt tuberkulózy roste i v zemích s vysokou hospodářskou úrovní. Podle WHO je rozložení infektované populace toto: Afrika (35%); Jižní a Severní Amerika (18%); Blízký východ (29%); Evropa (15%); Jihovýchodní Asie (44%) a Západní Pacifik (35%). Statistiky předpovídají, že bez jakéhokoliv úsilí o zvládnutí této situace bude roku 2020 tuberkulózou nakaženo až miliarda lidí [2].

Infekce jako je HIV potlačující imunitní systém, dělá jedince náchylnější k TB nebo umožňuje aktivaci latentní infekce TB. Další ko-infekce urychlují postup TB i HIV. Navíc je běžná retrovirotická léčba HIV/AIDS neslučitelná se současnou léčbou TB, kvůli společným toxicitám a lékovým interakcím.

Současné léky první volby užívané při léčbě TB jsou starší více než 40 let a léčba sestává hlavně z rifampicinu a isoniazidu. Tyto antibiotika jsou efektivní proti aktivním,

lékově citlivým mykobakteriím, zajišťují dokončení léčby [1].

Multi-rezistentní tuberkulóza (MDR-TB)

Objevily se rezistentní bakterie, na které nepůsobí léky první volby. Zatímco rezistence na jedno antituberkulotikum je častá, zasažený pacient reaguje dobře na standartní léčbu. MDR-TB je většinou definována u pacientů s aktivně probíhající TB s bakteriemi rezistentními minimálně na rifampicin a izoniazid. Nicméně nyní je 79% MDR-TB rezistentní na nejméně tři léčiva ze čtyř nejdůležitějších antituberkulotik užívaných k léčbě TB a podle WHO přibývá 300 000 nových případů MDR-TB ročně. Hlavní příčina MDR-TB je přerušovaná či nepřiměřená léčba a nedostatečně fungující systém veřejného zdraví. Také kompliance pacientů je malá vzhledem k ceně léků, nežádoucím účinkům, časové náročnosti pro plné vyléčení a množství dávek léčiv. Pokud dojde k MDR-TB, léčba vyžaduje trvání dvou let méně aktivními a mnohem dražšími léky, zahrnující léky první volby, na které jsou bakterie stále citlivé a léky druhé volby. Podle WHO, by měla léčba obsahovat alespoň čtyři léky, které nebyly dosud pacientem užívány. Pyrazinamid a ethambutol mohou být použity díky nižší pravděpodobnosti vzniku rezistence na ně než na ostatní léky první volby [1,2].

Mnohočetně lékově rezistentní tuberkulóza (XDR-TB)

Mnohočetně lékově rezistentní tuberkulóza (XDR-TB) je forma TB způsobená bakteriemi rezistentními ke všem nejúčinnějším antituberkulotikům a vzniká díky špatnému vedení MDR-TB léčby. XDR-TB je rezistence vůči rifampicinu a isoniazidu a rezistence na léky druhé volby a jsou teoreticky neléčitelné. XDR-TB vyvolává obavy o budoucí epidemii TB s velmi omezenou možností léčby. Poté, co jednou vznikne XDR-TB, může se šířit z jedné osoby na druhou [1].

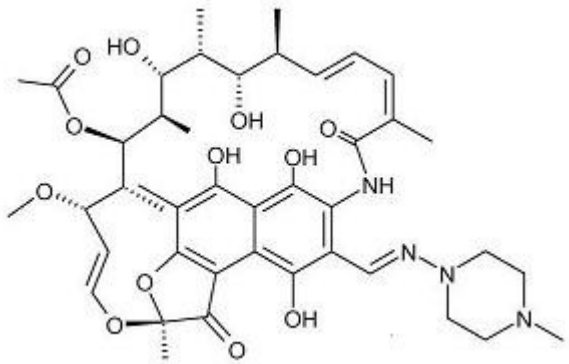
2.2 Antituberkulotika první volby

Nejdůležitějšími cíly antituberkulotické léčby je usmrtit aktivně metabolizující bakterie v plicích a eliminovat pomalu se replikující a semidormantní bakterie, které mohou způsobit relaps nemoci. WHO doporučila DOTS (directly observed treatment, short course) léčbu TB podáváním čtyř léků: izonoazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA) a ethambutol (EMB) nebo streptomycin (SM), které jsou označovány jako léky první volby. Ty jsou podávány po dva měsíce, aby zajistily destrukci bakterií ve všech fázích růstu. Poté léčba pokračuje podáváním jen RIF a INH po čtyři měcíce, kdy jsou zničeny zbylé dormantní bakterie rifampicinem a INH zničí bakterie rezistentní vůči RIF [1].

Rifampicin a ostatní ryfamyciny

Rifamyciny jsou skupina ansamycinových antibiotik charakterizovaná chromoforní naftohydrochinonovou či naftochinonovou skupinou přemostěnou dlouhým alifatickým můstkem. To vede k charakteristickému zbarvení těchto látek do žluta až červena. Tyto antibiotika jsou vyráběny bioisynteticky z izolátu *Streptomyces mediterranei* rifamycinu B [2,3,4]. Mechanismus účinku je založen na inhibici DNA-dependentní RNA-polymerázy, která je zodpovědná za přenos informace z DNA do bílkovin. Rifamyciny interagují s β jenotkou, což vede ke stabilní konformaci celého enzymu [2].

Rifampicin

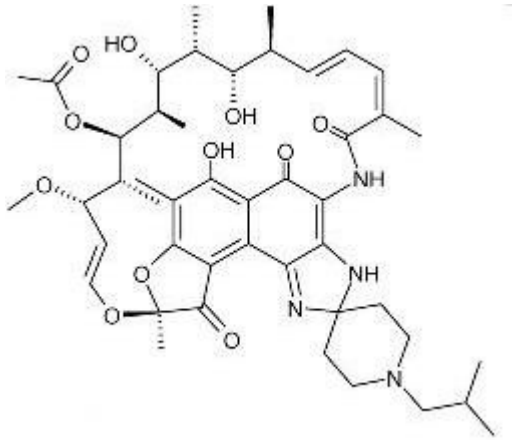


Rifampicin je nejstarším léčivem této skupiny. Má široké spektrum účinku, zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie, některé anaeroby, chlamydie a ricketsie [3].

Díky kombinaci rifampicinu s ostatními léky první volby bylo možno zkrátit trvání léčby z 12 na 6 měsíců. Vznik rezistence na rifampicin zvýšil nebezpečí tuberkulózy a problém její kontroly v celosvětovém měřítku. Tato rezistence vzniká během terapie aktivní infekce tuberkulózy a bývá zapříčiněna mutacemi genu (*rpoB*) pro *β* jednotku RNA. Inaktivace

rifampicinu může být také zapříčiněna glykosilací a fosforylací. Tato rezistence bývá zkřížená mezi všemi rifamyciny [2].

Rifabutin

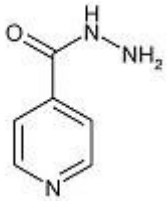


Rifabutin je první rifamycin povolený pro prevenci MAC (*Mycobacterium avium* complex) u lidí s pokročilou infekcí HIV. Tento rifamycin je užíván v kombinaci s dalšími léčivy jako ciprofloxacin, ethambutol a amikacin [2].

Rifametan

Rifametan má značně výhodnější farmakokinetický profil než rifampicin. Nedávno vstoupil rifametan do fáze II klinického zkoušení [2].

Isoniazid

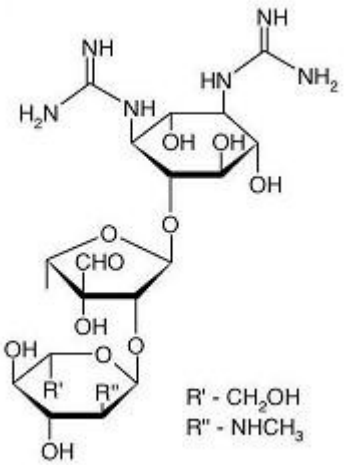


Isoniazid , hydrazid kyseliny isonikotinové, působí bakteriostaticky až baktericidně na aktivně metabolizující i klidová stádia *M. tb*. INH je proléčivo, které musí být aktivováno mykobakteriální katalázou-peroxidázou. Tento enzym určuje citlivost *M. tb* k isoniazidu [3,4]. Aktivovaný INH inhibuje mykolátsyntetázu, enzym zajišťující syntézu kyseliny mykolové, která je nutná pro tvorbu buněčné stěny mykobakterií [3]. Mykolátsyntetáza je jedinečná pro mykobakterie. INH je vysoce aktivní i proti *Mycobacterium tuberculosis k*omplex (*M. tb.*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*) [4].

Po perorálním podání nalačno se rychle a skoro úplně vstřebává. Dobře proniká i do mozkomíšního moku. Nežádoucí účinky jsou závislé na dávce a nejčastěji bývá postižena nervová soustava a jaterní funkce. Postižením nervového systému bývá periferní neuropatie projevující se paresteziemi horních a dolních končetin. INH snižuje hladinu pyridoxinu (vit. B6) a následkem toho také GABA, což vede ke křečím. Proto je

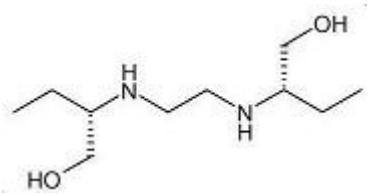
pyridoxin při léčbě isoniazidem podáván preventivně. INH je určen k léčbě všech plicních i mimoplicních forem tuberkulózy, především v kombinaci s jinými antituberkulotiky, a profylaxi plicních forem [4,5].

Streptomycin



Streptomycin (přesněji streptomycin A) je aminoglykosidové antibiotikum izolované ze *Streptomyces griseus*. Skládá ze tří strukturálních komponent – streptidinu, streptózy a N-methyl-L-glukosaminu. Jedná se o první účinné léčivo, které se proti TB začalo používat. Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy proteinů. Z důvodů nízké absorpce z gastrointestinálního traktu se aplikuje intramuskulárně (do svalu) a velmi výjimečně i intrathekálně (lumbální punkce v bederní oblasti páteře). Vzhledem k množství toxických účinků na periferní i centrální nervový systém není často používán [3,4].

Ethambutol

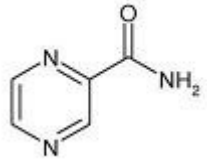


Ethambutol (EMP) je syntetický aminoalkohol (ethylendiamino-di-1-butanol) specificky působící bakteriostaticky na aktivně rostoucí různé kmeny mykobakterií jako *M. tb.*, *M. bovis*, *M. kansasii,* ale má malou sterilizační aktivitu. Je účinný po perorálním podání, který se velmi dobře vstřebává [4,5]. Mechanismus účinku pravděpodobně spočívá v inhibici biosyntézy lipoarabinomannanu a arabinogalaktananu, nezbytných pro zachování integrity mykobakteriální stěny. Aktivita léčiva je stereospecifická, účinný je hlavně pravotočivý S,S-(+)-izomer (600krát účinnější než R,R izomer), ostatní stereoizomery jsou spíše neúčinné a toxické [3,4]. Nejzávažnějším nežádoucím působením ethambutolu je retrobulbární neuritida se snížením ostrosti vidění, zúžením

zorného pole, centrálním nebo periferním skotomem a červeno-zelenou barvoslepostí.

Ethambutol se nepoužívá samostatně, ale je přidáván do lékových kombinací. Zkřížená rezistence nebyla prokázána. Primární rezistence na etambutol je v rozvinutých zemích řídká, ale pokud se etambutol používá samostatně, snadno vznikají rezistentní kmeny *M. tb.* [5].

Pyrazinamid



Pyrazinamid (dále PZA) je analog nikotinamidu (prekurzor vitamínu B3). Objev PZA koncem 40. let jako účinného léčiva TB byl založen na pozorování, že nikotinamid má antituberkulózní účinek na zvířecích modelech. PZA je důležitým předním léčivem a hraje klíčovou roli ve zkrácení léčby z 9-12 měsíců na současných 6 měsíců. To je možné díky baktericidnímu účinku na populaci pomalu se dělících semidormantních tuberkulotických bakterií přežívajících v kyselém prostředí (vzniklém během aktivního zánětu), které nebyly usmrceny jinými antituberkulotiky. PZA je považován za účinný na mykobakterie i uvnitř makrofágů [6,7,8].

Mechanismus účinku: Je předmětem intenzivního výzkumu, protože stále není jasně vysvětlen. Máme předpokládaný model způsobu účinku PZA, kde jako lipofilní proléčivo prochází buněčnou stěnou a v cytoplazmě je hydrolyzován na aktivní kyselinu pyrazin-2-karboxylovou (dále POA). Hydrolýzu zajišťuje mykobakteriální pyrazinamidáza (Pzáza) kódovaná genem pncA [6,8,9].

M. tb. je jediným druhem citlivým na PZA. Citlivost *M. tb.* na PZA koreluje s přítomností tohoto enzymu s nikotinamidázovou a pyrazinamidázovou aktivitou [8]. Kmeny *M.t b.*, které jsou rezistentní k PZA mají často defektní aktivitu Pzázy. Bylo dokázáno, že mutace genu pncA je hlavním mechanismem vzniku rezistence [8,9]. Malé množství mutací zodpovědných za rezistenci vůči PZA se nalézá i mimo gen pncA, ale ty zatím nebyly charakterizovány blíže [10].

POA vzniklá hydrolýzou poté difunduje zpět na povrch buněčné stěny slabým efluxním systémem. V kyselém prostředí je POA, jako slabá kyselina, protonována a bez náboje prochází spontánní difúzí zpět do bacilu. Takto může spontánně difundovat jakákoliv slabá kyselina v protonované formě do dosažení rovnováhy. Rovnováhy je dosaženo, když se

koncentrace protonované POA na obou stranách membrány vyrovnají. Protože cytosol žijící buňky M. tb. udržuje pH hodnotám blízkým 7, většina POA je zde v disociované formě pyrazinoátu a celková koncentrace POA je více než 1 000x vyšší než protonované POA. Takto je rovnováha posunuta ve prospěch protonované formy jen v kyselém prostředí a akumulace je dosaženo rozdílem pH vně a uvnitř buňky. Tento vztah může být vyjádřen Henderson-Hasslebalchovou rovnicí [6].

Tato hypotéza předpovídá, že snížení vnějšího pH o 1 jednotku by mělo vést k zvýšení akumulace 10x. Nicméně pozorované zvýšení akumulace bylo jen 3-4násobné. Jeden z možných důvodů může být pomalý eflux POA. Nicméně rychlost pasivní difúze POA značně převyšuje rychlost aktivního efluxu, což vede k obrovské akumulaci POA v buňkách [8].

M. t. Na rozdíl od *M. smegmatis* a jiných bakterií jako *Escherichia coli (E. coli)*, které jsou vnitřně rezistentní vůči PZA (MIC > 2000 mg/L) postrádá účinný efluxní mechanismus, což umožňuje akumulaci POA ,a možná lepší schopnosti zachovávat energii membrány a pH homeostázu. Nedostatečný efluxní mechanismus je proto považován za původ této jedinečné citlivosti na POA mezi dalšími mykobakteriemi [6,9].

V různých bakteriálních systémech vyžaduje příjem mnoha živin do buňky membránový potenciál (protonovou hnací sílu). Vstup protonované formy POA může poškodit membránový potenciál, což může případně vést k inhibici transportních funkcí membrány. Staré nebo semidormantní bakterie mají méně aktivní metabolismus a menší zásoby energie, mají i nižší membránový potenciál. Nízký membránový potenciál těchto starých nereplikujících se bakteriích a neefektivní eflux POA s relativně malou schopností udržovat energii membrány vytváří prostor pro účinek POA v kyselém prostředí, která snižuje membránový potenciál na ještě nižší hodnoty. Jako následek tohoto snížení membránového potenciálu, který je potřebný pro membránový transport, je také nejlépe vysvětlena současná inhibice syntézy různých makromolekul, jako jsou bílkoviny a RNA, a uptake serinu. (Inhibice syntézy RNA a bílkovin byla potvrzena pozorováním velké míry inhibice vychytávání uracilu a methioninu v přítomnosti POA v kyselém prostředí.) [6,7]

Protože je membránový potenciál důležitý i pro syntézu ATP F_1F_0 ATPázou, snížení membránového potenciálu způsobeném POA způsobí ve starých bakteriích s malými zásobami energie vyčerpání energie a tím i snížení životaschopnosti. Tyto údaje signalizují, že cílem POA nebo PZA je membrána a interferují s aktivitou a funkčností membrány [7].

Tento model tak nejlépe vysvětluje charakteristické vlastnosti PZA, jako je podmínka

kyselého pH pro aktivitu, upřednostněné usmrcování pomalu metabolizujících starých mykobakterií a vyšší aktivita v anaerobních podmínkách. Tento model je také potvrzen výraznou specifickou potenciací účinku PZA energetickými inhibitory jako N,N'-dicycklohexylkarbodiimid (inhibitor H-ATPázy), azid (inhibitor cytochrom c-oxidázy) a rotenon (inhibitor NADH-dehydrogenázy) [6].

Jako další cíl účinku PZA byla předpokládána inhibice syntázy mastných kyselin („Fatty acid synthasa", dále FAS). FAS je nezbytná pro udržení buněčné stěny, protože katalyzuje sekvenční kondenzaci acetyl-koenzymu A a malonyl-CoA do dlouhých řetězců mastných kyselin. Struktura tohoto enzymatického komplexu se velmi liší u prokaryot a eukaryot. Ve většině prokaryot jsou syntázy složeny z minimálně sedmi peptidů, které představují jednotlivé komponenty enzymu a jsou zpravidla klasifikovány jako syntáza mastných kyselin typu II (FAS-II). Naopak u savců a mykobakterií zajišťuje syntézu mastných kyselin jediný vysokomolekulární multifunkční peptidický řetězec neboli syntáza typu I (FAS I) [9].

Bylo však prokázáno, že POA nevykazuje dostatečnou inhibici FAS I izolované z M. smegmatis (POA je účinný inhibitor FAS I až při koncentraci 0.37 mg/ml, což je 6 až 23x vyšší koncentrace než MIC) [9,11]. Nicméně se zjistilo, že 5-Cl-PZA irreverzibilně inhibuje FAS-I, což může být zapříčiněno mezomerním efektem atomu chloru v pozici 5 na pyrazinovém jádru. To usnadňuje atak příslušného nukleofilu na uhlík v tomto kruhu a vznik kovalentní vazby, což by vysvětlovalo neúčinnost dialýzy při pokusech hydrolyzovat tuto vazbu [11].

Dále byl prokázán vliv dalších faktorů na účinnost PZA *in vitro* a to: stáří kultury, velikost inokula, hypoxické podmínky, UV záření (synergní účinek – výrazně zvyšuje citlivost na PZA pravděpodobně tím, že díky němu vznikají radikály, které poškozují makromolekuly jako DNA a taky buněčnou membránu), přítomnost některých dalších slabých kyselin (benzoová, sorbová, propylhydroxybezoová), železa [6].

Faktory, které ovlivňují aktivitu PZA, jsou nejlépe ukázány na zkouškách lékové expozice (z angl. „drug exposure assays") a ne konvenčním měřením MIC. To je způsobeno neobvyklou povahou PZA, který je více aktivní proti semidormantním bakteriím než rychle metabolizujícím a rostoucím bakteriím, což je vlastnost úplně opačná než mají běžná antibiotika. Další neobvyklá vlastnost PZA je časová závislost vykázané aktivity. To znamená, že trvá několik dní až týdnů než se projeví nějak významná aktivita. Předpokladem je reakce na časovou latenci než je PZA hydrolyzován na POA a než se vyčerpají energetické zásoby pro zachování životaschopnosti bakterie a nemožnost zkoumat pomalu metabolizující jedince v médiu, které podporuje růst bakterií.

Příkladem je i měření citlivosti perzistujících *E.coli* na PZA zkouškou lékové expozice. PZA nemá žádnou aktivitu proti *E. coli*, jak bylo dokázáno naměřenou rezistencí na koncentrace PZA vyšší než 2000 mg/L při pH 5,5 pomocí zkoušky měřící MIC. Ale když byly rostoucí bakterie usmrceny vystavením působení ampicilinu, zbylé perzistující bakterie s pomalým metabolismem byly citlivější na působení PZA [6,8].

Aktivní léčivo POA není k léčbě TB užíváno přímo, protože bakteriální aktivita POA po orálním podání infikovaným myším nedosahovala aktivity PZA. Předpokladem je nízká absorpce gastrointestinálním traktem a značná vazba na sérové proteiny [8].

Farmakokinetika: Všeobecně se předpokládá, že je PZA téměř úplně absorbován z gastrointestinálního traktu. Zdá se, že u dětí je absorpce opožděná či snížena. PZA je distribuován do většiny tkání včetně plic, ledvin, jater, proniká hematoencefalickou bariérou do mozkomíšního moku a prochází membránou makrofágů. Váže se na proteiny z 10-20%. PZA je v játrech metabolizován mikrozomální deaminázou na aktivní metabolit POA a následně hydroxylován na 5-hydroxy-POA. PZA má střední interindividuální variabilitu u dospělých, střední clearense u dětí je vyšší, což snižuje poločas PZA o 43%. Nehydrolyzovaný PZA je v ledvinách filtrován a poté zčásti zpětně reabsorbován. Metabolické produkty jsou vylučovány také ledvinami [10,12].

Nežádoucí účinky: Nejběžnějším vážným nežádoucím účinkem je lékově vyvolaná hepatitida. Toxické účinky PZA jsou závislé na dávce a trvání podávání léku a mohou se objevit kdykoliv během léčby. Incidence vedlejších účinků bývá zvýšena u žen, starších pacientů, asiatů, pacientů s renální insuficiencí a HIV pozitivních. Je doporučeno vyšetření základních funkcí jater ještě před začátkem léčby PZA. Také snižuje renální exkreci urátů, což může vést ke dně u predisponovaných jedinců. Pokud je hyperurikémie vážná nebo je doprovázena akutním záchvatem dny, podávání PZA by mělo být přerušeno. Dalšími nežádoucími účinky jsou ataralgie, nauzea, zvracení, dysurie, teplota a sideroblastická anémie [10,12].

Interakce: PZA snižuje účinnost allopurinolu. V době podávání PZA by mělo být omezeno užívání alkoholu. PZA je kontraindikován pacientům užívajících nadměrné množství alkoholu, pacientům s latentní tuberkulózou, kteří užívají potenciálně hepatotoxické léčiva, nebo tomu, kdo již prodělal onemocnění asociované na užívání izoniazidu. V těchto případech by musel přínos léčby převážit nad riziky jaterních nežádoucích účinků [10,12].

2.3 Antituberkulotika druhé volby

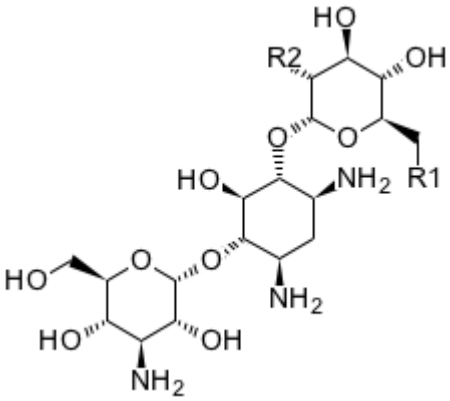
Léčiva bývají řazeny mezi léčiva druhé volby ze dvou důvodů:

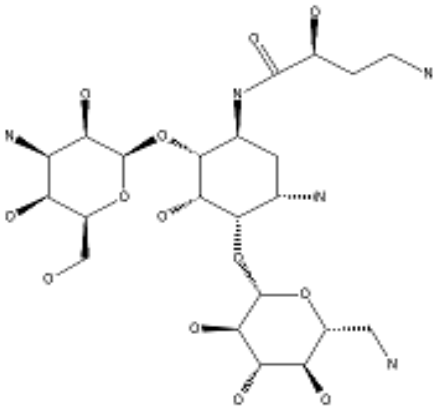
1) jsou méně efektivní než léčiva první volby nebo mají toxické vedlejší účinky

2) můžou být nedostupné v mnoha vývojových zemích.

Mezi léčiva druhé volby patří tyto skupiny:aminoglykosidy (amikacin, kanamycin), polypeptidy (kapreomycin, viomycin), fluorochinolony (ciprofloxacin), thioamidy (ethionamid, protionamid), cykloserin, kyselina *p*-aminosalicylová a klofazimin [4].

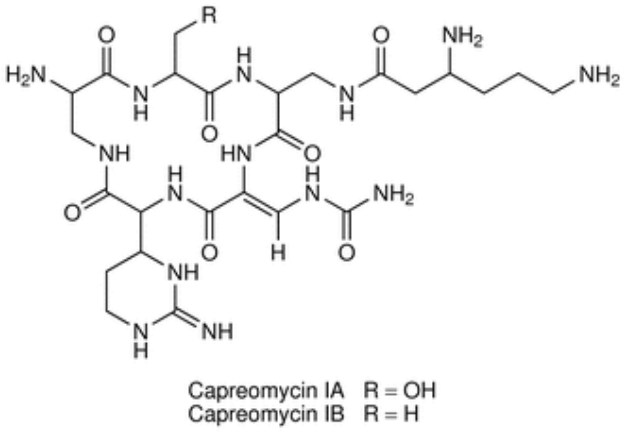
Kanamycin a amikacin





Kanamycin je aminoglykosidové ATB používané na různé typy bakteriálních infekcí včetně způsobených *M. tb.* Amikacin je od kanamicinu odvozen, má však delší biologický poločas a je méně ototoxický [3]. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin. Kanamycin (amikacin) se váže na na 30S podjednotku ribosomu a blokuje translaci mRNA. Nežádoucímu účinky je nefrotoxicita, již zmíněná ototoxicita a neurotoxicita [4].

Kapreomycin



Kapreomycin je polypeptidové ATB s bakteriostatickým účinkem působící na intracelulárně uložená mykobakteria, především na *M. tb*. Kapreomycin se váže RNA a tím zabraňuje splicingu a inhibuje syntézu bílkovin. Má často zkříženou rezistenci s neomycinem, a kanamycinem. Mezi hlavní nežádoucí účinky patří nefrotoxicita a poškození VIII. Hlavového nervu. Kapreomycin patří mezi antituberkulotika, které se užívají výhradně v kombinaci [4].

Fluorochinolony

Fluorochinolony (kyselina 7-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-chinolin-3-karboxylová) jsou důležitá skupina s širokým spektrem antibakteriální aktivity proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, anaerobům a mykobakteriím. Má velký terapeutický potenciál obzvláště u organismů rezistentních na jiné skupiny antibiotik. Důležitost fluorochinolonů v boji proti infekčním nemocem začala, když byl objeven norfloxacin. Tato sloučenina prezentovala široké spektrum účinku a lepší farmakokinetické vlastnosti proti gramnegativním a některým grampozitivním bakteriím v závislosti na kombinaci atomu fluoru na pozici 6 a piperazinylu na pozici 7. Po tomto důležitém objevu bylo syntetizováno velké množství fluorochinolonů z cílem zdokonalit některé vlastnosti jako rozpustnost, antimikrobní aktivitu, prodloužit sérový poločas, snížit nežádoucí účinky a to cestou p.o. i parenterální. V tomto kotextu mohou být vyzdviženy např. ciprofloxacin, ofloxacin a enofloxacin [2,4].

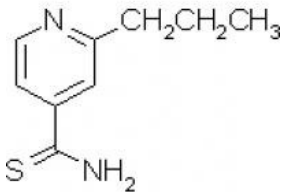
Jejich účinnost je založena na inhibici bakteriální DNA gyrázy (=topoizomeráza II) nebo topoizomerázy IV DNA gyráza je nezbytný enzym pro replikaci, transkripci a reparaci bakteriální DNA. Topoizomeráza IV zodpovědná za rozdělení DNA do dvou dceřinných buněk na konci replikace. V gramnegativních bakteriích je primární cíl DNA gyráza, zatímco u grampozitivních bakterií je poškozena topoizomeráza IV [2].

Stupeň rezistence k fluorochinolonůma jejich relativně nízká baktericidní účinnost na mykobykterie je limitující pro jejich použití při léčbě tuberkulózy [1].

Thioamidy

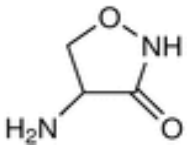
Thioamidy jsou deriváty kyseliny isonikotinové a jsou zastoupeny dvěmi látkami – ethionamid a protionamid [4]. Jsou to relativně toxická bakteriostatická antituberkulotika. Strukturně mají blízko k INH a mají téměř stejný inhibiční účinek na syntézu kyseliny mykolové [3,4].

Ethionamid



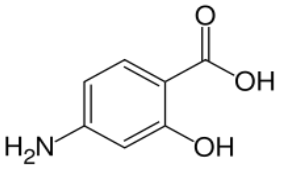
Ethionamid je aktivní proti *M. tb.*, *M. leprae*, *M. kansasii*, a některým kmenům *MAC.* Nežádoucí účinky ethionamidu a protionamidu jsou gastrointestinální potíže (anorexie, slinění, nauzea, bolest břicha a průjem), psychické poruchy (deprese, úzkostná porucha, zmatenost, ospalost a bolesti hlavy) [4]. Tyto vedlejší účinky omezily jejich použití jen pro léčbu plicní a mimoplicní MDR-TB [3,4].

Cykloserin



Cykloserin je strukturní analog aminokyseliny D-alaninu s širokým spektrem proti bakteriím včetně *M. tb*. Cykloserin inhibuje biosyntézu peptidoglykanu v časném stádiu a tím i tvorbu buněčné stěny. Nežádoucí účinky se projevují jako postižení centrální nervové soustvy bolestmi hlavy, depresemi a křečemi. Cykloserin se uplatňuje v léčbě aktivní TB jen v případech, kdy selhala léčba antituberkulotiky první volby [4].

Para-aminosalicylová kyselina

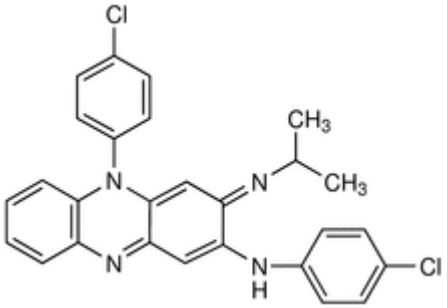


Para-aminosalicylová kyselina má slabší aktivitu na *M. tb.*, na které působí bakteriostaticky [4]. Za mechanismus účinku se dříve pokládala kompetetivní inhibice

syntézy kyseliny dihydrolistové (strukturní podobnost s kyselinou p-aminobenzoovou), pravděpodobnější je zabránění přenosu kationtů železa jejich chelatací. Nevýhodou je nutnost vysokých terapeutických dávek a vysoké riziko vzniku rezistence [3].

Používá se při léčbě MDR-TB v kombinaci se SM a INH [4].

Klofazimin



Určitá účinnost na *M. tb.* byla zaznamenána i u klofaziminu, sloučeniny odvozené od iminofenazinu. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na guanin mykobakteriální DNA. Díky své lipofilitě má velmi dlouhý biologický poločas.

Klofazimin se používá hlavně při léčbě lepry, způsobené *M. leprae* a využívá se při terapii mykobakterióz u imunodeficitních pacientů [3].

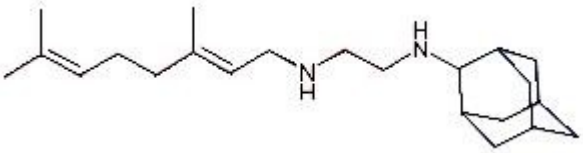
2.4 Potenciální léčiva

Situace se všeobecně zkomplikovala s rostoucím počtem pacientů s MDR-TB, kdy je léčba vedena méně účinými, více toxickými a dražšími léky, a ko-infekcí HIV/AIDS, která aktivuje latentní formu TB a/nebo urychluje její postup. Proto je nutná potřeba nových léků, které by zkrátily délku léčby, byly účinnější, bezpečnější a navíc byly vhodné pro pacienty s ko-infekcí HIV/AIDS [4].

Nyní jsou zkoumány a vyvíjeny různé skupiny sloučenin k objevu nových antituberkulotik. Například thiolaktomycin a analogy, analogy ethambutolu, analogy meflochinu, deazapteridiny, benzylpuriny, benzoxaziny, diterpenoidy, imidazo(4,5-c) pyridiny, tryptanthrin a analogy, fenaziny, 1,2,4 triazoly, analogy isoniazidu, fulleropyrrolidiny, deriváty toluidinu, sacharidy, chinolony, oxazolidinony,a analogy mikonazolu. Mezi novými patenty, jsou nové skupiny s antituberkulotickou aktivitou jako deriváty pyrrolidin-2,5-dionů a piperidin-2,6-dionů, sulfosloučeniny, halogenovaná kyselina p-aminosalicylová a thioacetazony a p-guanidinosalicylát [2]. Nedávno byly zkoumány nové cíle jako inhibitory signalizačních kináz. Přežití *M. tb.* navzdory fagocytóze makrofágem se zakládá nejen na přítomnosti silné buněčné stěny, ale i na funkci mnoha mykobakteriálních kináz a fosfatáz, které narušují obranné mechanismy buněk hostitele [4].

Zde jsou uvedena některá potencionální antituberkulotika:

SQ109

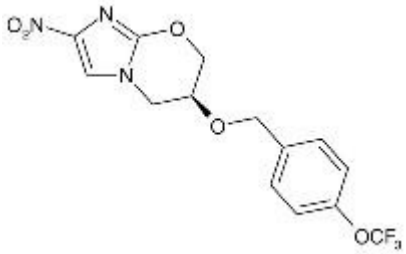


SQ109 je diaminový analog ethambutolu (EMB) a obsahuje nenasycené izoprenové jednotky a objemný adamantinový kruh. Byl vybrán díky své výborné aktivitě *in vitro* i *in vivo* včetně proti kmenům *M.tb.* Rezistentním na EMB, INH a RIF. Jeho biologická dostupnost je sice omezená, ale má velký objem distribuce do různých tkání, obzvláště do plic, což je pravděpodobně díky přítomnosti adamantinového kruhu. SQ109 je rychle metabolizován v játrech a je možné, že je ve skutečnosti proléčivem, jehož mechanismus účinku není přesně znám, i když se věří, že je to syntéza buněčné stěny jeko u EBM, ale jiným způsobem, protože je aktivní i na EBM-rezistentní kmeny. To naznačuje existenci

jiného specifického cíle nebo zbůsobu aktivace. Nebyl sledován antagonismus SQ109 s žádným lékem první volby, přičemž kombinace s RIF (nebo INH) vykazuje synergismus, pravděpodobně zvýšenou aktivací SQ109 díky indukci cytochromu P450 (CYP), který produkuje aktivní oxidované metabolity. Bylo by zajímavé zjistit, zda se tento synergismus zachován i s rifabutinem, který indukuje CYP mnohem méně. Experimenty na myších modelech také ukázali synergismus, když je SQ109 použit v kombinaci s INH, RIF a PZA.

Zdá se, že SQ109 by mohl zkrátit trvání léčby TB. První zprávy z klinické studie fáze Ia, dokončené 2007, popisují rychlou a obsáhlou distribuci do tkání po podání p.o. a dlouhý poločas. To napovídá, že podávání jednou týdně může být dostatečné. U pacientů nebyly pozorovány žádné vážné vedlejší účinky [1].

PA-824



Bicyclický nitroimidazo[2,1-b]oxazin PA-824 nemá navzdory chemické spřízněnosti k mutagenním nitroimidazofuranům žádné nepříznivé mutagení vlastnosti a zároveň má vysokou antituberkulotickou aktivitu. PA-824 vykazuje vysokou antimykobakteriální aktivitu *in vitro* proti metabolicky aktivním, nereplikujícím se i rezistentním bakteriím. Mechanismy účinku jsou dva – inhibice syntézy lipidů a proteinů buněčné stěny a druhý, který není zatím vysvětlen, ale díky němuž léčivo působí na nereplikující se mykobakterie.

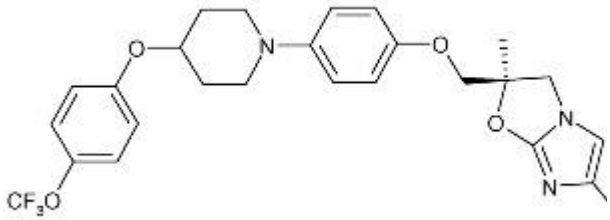
PA-824 je ve skutečnosti proléčivo, které je pravděpodobně aktivováno redukcí aromatické nitroskupiny na aminoskupinu. Rezistenci si bakterie vytváří ztrátou specifické glukózy-6-fosfát-dehydrogenázy nebo jejího deazaflavin kofaktoru F420, který zajišťuje elektrony pro redukční reakci [1,4]. Tyto problémy však nemusí být zásadní, protože požadovaná nitroredukce bude dosažena nízkým redoxním potenciálem prostředí, které vzniká v lidských hypoxických kaseózních ložiscích, ale ne v myších ložiscích. Nebyla zjištěna zkřížená rezistence k jiným současným antituberkulotikům.

PA-824 má dlouhý poločas a asi se v těle kumuluje, ale zatím není dostatek informací týkajících se metabolismu, které by mohly vysvětlit tyto farmakokinetické vlastnosti. Náhrada INH PA-824 v běžné léčbě vede k vyšší efektivitě na myších modelech. Nicméně substituce RIF či PZA je neprospěšná pro účinnost léčby a byla sledována vyšší frekvence relapsů po šesti měsících léčby RIF, INH a PA-824, což naznačuje omezenou baktericidní

schopnost PA-824.

PA-824 v této době podstupuje klinické zkoušení fáze II [1].

OPC-67683

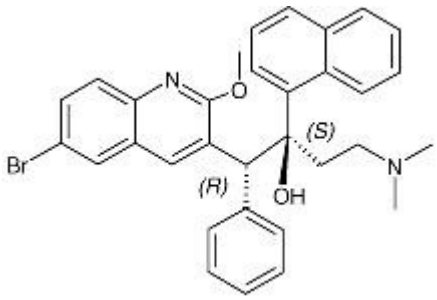


Syntéza a testování řady 6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazolů vedla k objevu látky označené OPC-67683 , která vykazuje výbornou aktivitu in vitro proti citlivým i rezistentím kmenům *M.tb.* A zároveň nebyla pozorována zkřížená rezistence k žádném léčivu první volby. Nepravidelné nebo nízké dávkování může být také účinné. Dlouhý poločas, nízký metabolismus enzymy CYP a vysoká účinnost u imunokompromisních myší napovídá, že toto léčivo by mohlo být použito při léčbě pacientů s ko-infekcí TB/HIV.

Jedinečná struktura buněčné stěny mykobakterií, bohatá na mykolovou kyselinu, je cílem účinku OPC-67683, který inhibuje syntézu kyseliny methoxy-mykolové a keto-mykolové jako INH, ale v značně nižších koncentracích. Není známo, jestli působí na syntézu bílkovin (jako v případě PA-824) nebo interaguje s jinými cílovými strukturami *M.tb.* OPC-67683 je proléčivo, které *M.tb.* Metabolizuje na hlavní metabolit desnitro-imidazooxazol. OPC-67683-rezistentní kmeny mykobakterií nemetabolizují léčivo na tuto aktivní formu.

Kombinace OPC-67683 s léky první volby RIF, INH, EMB a SM nevykazuje žádné antagonistické interakce, přes synergistické interakce vyskytující se s RIF nebo EMB *in vitro*. Kombinace OPC-67683 s RIF a PZA na 2 měsíce následovaná kombinací s RIF na další dva měsíce na myších modelech prakticky eliminovala všechny plicní mykobakterie během tří měsíců a úplně je eliminovala během dalších čtyř měsíců. To napovídá, že OPC-67683 má velkou baktericidní schopnost a mohl by zkrátit léčbu.
Nedávno byla úspěšně dokončena II. fáze klinického zkoušení [1].

TMC207



Ze série diarylchinolinů (DARQs), které byly zkoušeny proti *M.tb in vitro* i *in vivo*, je nejsilnější látka TMC207. Ta vykazuje vynikající aktivitu k lékově citlivým, MDR a XDR kmenům *M.tb.* Zdá se, že TMC207 má větší potenci proti mutovaným a lékově rezistentním kmenům než úplně citlivým [1]. Zároveň je účinný i na další významné mykobakterie jako MAC, *M. kansai* a rychle rostoucí *M. fortium* a *M. abscessus* [4].

Mechanismus účinku TMC207 spočívá v inhibici mykobakteriální ATP syntázy vázané na membránu. Tento jedinečný mechanismus účinku má velkou budoucnost, protože je malá podobnost mezi lidskou a mykobakteriální C jednotku ATP syntázy kódovanou genem atpE, která byla určena jako specifický cíl TMC207. Množství mutací TMC207-rezistentních kmenů bylo zjištěno právě v jednotce C. ATP syntáza má dvě strukturní domény (F_0 a F_1), které pracují jako biologický rotační motor: F_1 je v cytoplasmě, kde vyrábí ATP a F_0 se klene membránou a je uspořádána do tvaru disku a je tvořena jednou jednotkou A a 9-12 jednotkami C. Proud protonů řídí rotace tohoto disku. Normálně postraní řetězec jednotky A přijímá rozprostřenou konformaci, která dosahuje k jednotce C a předává proton. To vede k konformační změně jednotky A do kompaktní podoby a rotaci jednotky C. Předpokládaným mechanismem účinku na molekulární úrovni je napodobení jednotky A. To brání rotaci jednotky C i produkci protonů.

Pokud jsou mykobakterie rezistentní na TMC207, zůstávají nadále citlivé na ostatní antituberkulotika jako RIF, INH, SM a EMB.

Užití TMC207 samotného se zdá stejně efektivní jako kombinace RIF, INHa PZA a víc než RIF sám na myších modelech. TMC207 má vysokou baktericidní schopnost u guinejských prasátek a zároveň je 100x efektivnější než konvenční kombinace RIF, INH a PZA. TMC207 je u lidí dobře resorbován po podání per os, má dlouhý poločas, který vysvětluje účinnost při dávkování jednou týdně myším. TMC207 je metabolizován CYP3A4 a proto je jeho hladina po podávání s RIF značně snížena, proto není vhodný pro používání během léčby antiretrovirotiky. Kombinace TMC207 s léky první volby RIF, INH a PZA vede k nepřítomnosti mykobakterií v myších modelech již po dvou měsících. Byl také sledován synergismus TMC207 a PZA, kdy byly plicní mykobakterie zcela vyhubeny již

po dvou měsících. To může být následkem již zmiňované inhibice ATP syntázy pyrazinamidem. Kombinace TMC207 se současnými doporučenými léčivy na léčbu MDR-TB (amikacin, ethionamid, moxifloxacin a PZA) byla úspěšná při eradikaci infekce v plicích a slezině během dvou měsíců na myších modelech.

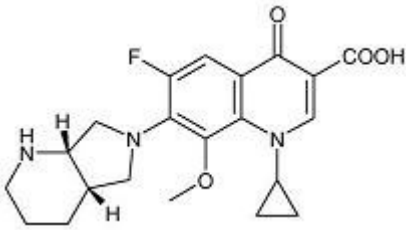
Fáze IIa klinického zkoušení ukázala dobrou toleranci pacienty, ale nižší samostatnou aktivitu než při monoterapii RIF nebo INH. Další studie zkoumající dlouhodobou bezpečnost a účinnost u pacientů s MDR-TB začala v polovině roku 2007 [1].

Další nadějnou látkou ze skupiny DARQs je R207910, jejíž MIC je stejná nebo nižší než referenčních sloučenin [4].

Fluorochinolony čtvrté generace

V současnosti se více pozornosti věnuje novějším fluorochinolonům, které jsou řazeny do čtvrté generace, vzhledem k jejich menším toxickým účinkům, zdokonaleným farmakokinetickým vlastnostem a vyšší aktivitě proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím, včetně rezistentních kmenů oproti starším fluorochinolonům. Rozdíl v účinnosti starších a novějších fluorochinolonů je jejich duální aktivita v inhibici obou enzymů, což i omezuje možnost vzniku rezistence. Jako příklady této generace mohou být uvedeny gatifloxacin, moxifloxacin a trovafloxacin [2].

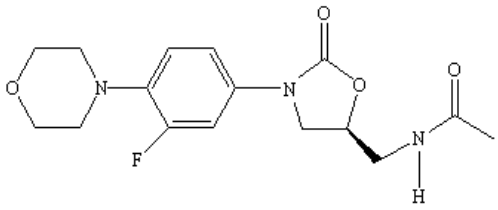
Moxifloxacin



Moxifloxacin vykazuje výbornou aktivitu proti škále různých bakterií, které způsobují infekce jako pneumonie, brochitida a sinusitida. Také má velmi dobrou aktivitu proti *M. tb. in vivo* a *in vitro, která byla srovnávána s* dalšími fluorochinolony oproti nimž má dobrou baktericidní aktivitu. Moxifloxacin má také výbornou biologickou dostupnost po podání p.o. a dlouhý poločas. Díky svým výhodným vlastnostem je klinicky zkoušen pro léčbu tuberkulózy.

Vzhledem k důležitosti fluorochinolonů v boji s tuberkulózou jsou jiné chinolony v preklinickém a klinickém zkoušení jsou i další zastupci jako sitafloxacin, gemifloxacin, PD 161148, CS-940 a T-3811ME [2].

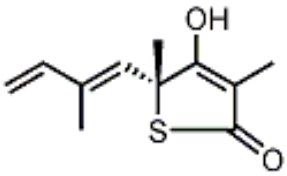
Linezolid



Patří do skupiny oxazolidinonů, nové skupiny antibakteriálních léčiv. Po zjištění antibakteriální aktivity některých zástupců, byly vyvíjeny další látky této skupiny dále navzdory tomu, že mnoho látek bylo pro svou toxicitu opuštěny. Později byly objeveny dvě netoxické látky, které byly pojmenovány linezolid a eperezolid. Linezolid byl FDA schválen pro léčbu infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi, které jsou rezistentní na jiná antibiotika např. vankomycin a penicillin. Tato skupina má nový mechanismus účinku založený na zastavení syntézy bílkovin konkrétně zablokováním iniciální fáze translace vazbou *N*-formylmethionyl-tRNA k 70S ribozomální jednotce.

Oxazolidinony mají slibnou akivitu proti *M. tb.* obzvláště při léčbě MDR-TB. Byly provedeny studie, při nichž se dokázalo, že linezolid je při léčbě MDR-TB účinný (v kombinaci s dalšími antituberkulotiky) a pro pacienty bezpečný [2].

Thiolaktomycin

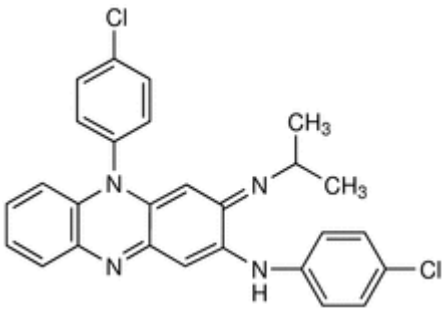


Přirozeně se vyskytující (5*R*)-thiolaktomycin (TLM) vykazuje aktivitu *in vivo* proti mnoha patogením bakteriím, včetně gramnegativních, grampozitivních bakterií. TLM se získává z izolátu rodu *Nocardia,* druhu aktinomycet, a má jedinečnou strukturu, která není zpřízněna s žádnými jinými skupinami známých antibiotik. TLM přímo inhibuje rostlinnou a bakteriální FAS II a fázi prodlužování při biosyntéze kyseliny mykolové.

Zatím nebyly publikovány žádné zprávy o účinnosti vůči *M. tb.* na zvířecích modelech. Nedávno byla dokázána i antimalarická aktivita. TLM má zanedbatelnou toxicitu a poskytuje značnou ochranu před záněty močových cest a intraperitoneálními infekcemi. U hlodavců je thiolaktomycin dobře absorbován po podání p.o.

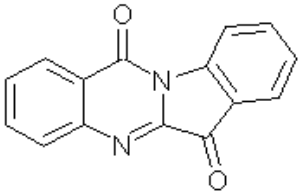
O toto nové antibiotikum je projevován značný zájem díky jeho širokému spektru účinku, výhodným fyzikálním a farmakokinetickým vlastnostem a nízké toxicitě [4].

Analogy klofaziminu



Bylo zjištěno, že tetramethylpiperidinové deriváty fenazinu B4169 a B4128 mají značně větší aktivitu proti *M. tb.*, včetně klinicky MDR kmenů, než klofazimin (viz obrázek) . Nejdůležitější přednosti těchto fenazinů jsou jejich intracelulární akumulace ve fagocytech, protizánětlivé působení, nízký výskyt vzniku rezistence a pomalá metabolická eliminace, což z nich dělá nadějné kandidáty pro léčbu mykobakteriálních infekcí [4].

Tryptanthrin



Tryptanthrin je strukturně originální indolinazolinonový alkaloid, aktivní proti MDR kmenům *M. tb.* s nízkou hodnotou MIC. Po určení toxikologických údajů by mohl tento strukturní prototyp sloučit k léčbě MDR-TB [4].

Další látky s možným novým mechanismem účinku

Množství látek je v klinickém či preklinickém zkoušení. Jedna z těchto sloučenin, pyrrol LL-3858, analog INH, má pravděpodobně fázi I klinického zkoušení za sebou. Další zajímavou látkou je OPC-37306, aktivní molekula objevená při skríningové studii inhibice biosyntézy kyseliny mykolové. OPC-37306 je aktivní na citlivé i rezistentní kmeny a zdá se, že je na myších modelech víc aktivní než RIF. O sloučenině FAS20013 je tvrzeno, že má schopnost eliminovat víc než 99% *M.tb* (včetně latentních) během 24 h, zároveň nebyly pozorovány žádné rezistentní kmeny a má dobrý farmakokinetický profil. Jiná slibná sloučenina je SQ-609 (jež interferuje se syntézou buněčné stěny, ale přesný cíl účinku zatím nebyl objeven) a SQ641 (inhibitor translokázy I, enzymu potřebného pro syntézu peptidoglykanu buněčné stěny), které jsou stále v preklinické fázi [1].

2.5 Perspektivy dalšího vývoje

Vzhledem k šířící se MDR-TB a XDR-TB stále přetrvává nutnost vyvíjet nová účinná léčiva s nižšími nežádoucími účinky, zdokonalenou farmakokinetikou, s vyšší aktivitou i proti rezistentním kmenům. Také je důležité, aby nově vyvíjené léky mohly zkrátit délku léčby Dále je nutno poznamenat, že při tomto vývoji léčiv, jejichž působení je založeno na inhibici bakteriálních struktur, je důležité více porozumět faktorům jako je lidský imunitní systém, podmíněnost citlivosti na genomu mykobakterií, účinek léků a vznik rezistence vůči nim na molekulární úrovni [4].

3 Teoretická část

3.1 Vlastnosti pyrazinového jádra

Před více než čtyřiceti lety vyšel v Chemických listech od autorů Libora Nováčka, Karla Paláta a Milana Čeladníka souborný referát s názvem Chemie pyrazinu. Za uplynulou dobu bylo v této oblasti získáno obrovské kvantum nových informací. Pyrazin, 1,4-diazin, představuje vysoce symetrickou molekulu. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů a chová se jako slabá dvojsytná baze (pK_1 = 0,57; pK_2 = -5,51). Pyrazinové jádro je planární útvar, který může být znázorněn jako rezonanční hybrid několika základních struktur. 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 [13,14,15,16].

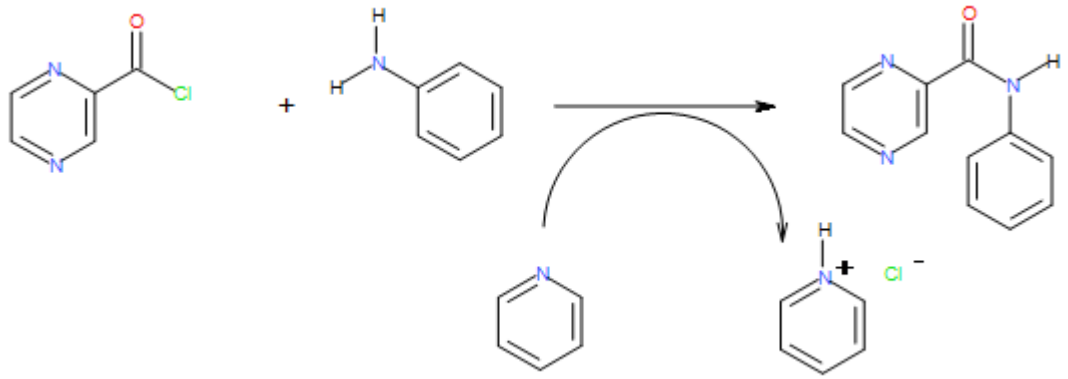
3.2 Příprava acylhalogenidů

Acylhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Nejvýhodnější syntézou z hlediska čistoty připravovaného acylhalogenidu se jeví být použití chloridu thionylu (thionylchlorid $SOCl_2$), protože veškeré zplodiny této reakce jsou plynné a dají se poměrně snadno z reakční směsi odstranit [17].

$$R\text{-}COOH + SOCl_2 \rightarrow R\text{-}COCl + SO_2 + HCl$$

3.3 Příprava anilidů karboxylových kyselin

Nejpoužívanější metodou přípravy anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny je aminolýza chloridu kyseliny. Aminolýza chloridů probíhá ve většině případů za velmi příznivých podmínek. Do reakční směsi se přidává pyridin, který je důležitý jako akceptor protonů uvolněné kyseliny, lze použít i jiný terciární amin. Jinak uvolněný chlorovodík vyváže 1 mol aminu [18].



4 Experimentální část

4.1 Přístroje a chemikálie

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

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

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím.

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

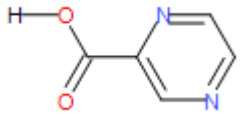
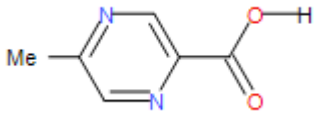
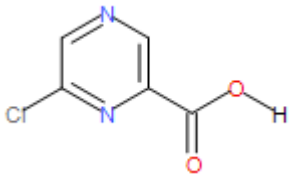
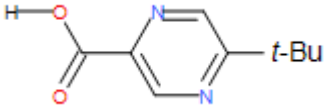
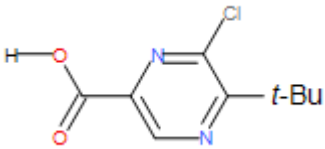
Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano, Itálie) provedla pí. Hronová na KFCHKL.

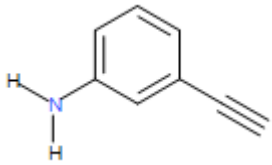
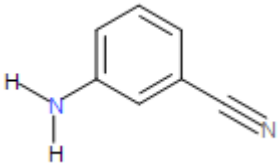
Infračervená spektra byla změřena pí. Vencovskou na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg Kbr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1}.

^{1}H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkury – Vx BB 300 (299,95 Mhz – ^{1}H a 75,43 Mhz – ^{13}C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc. PharmDr. J. Kuneš, Csc. Z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k $Si(CH_3)_4$.

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

4.2 Výchozí struktury

kyselina	pyrazin-2-karboxylová	
	5-methylpyrazin-2-karboxylová	
	6-chlorpyrazin-2-karboxylová	
	5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylová	
	6-chlor-5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylová	

anilin	3-ethynylanilin	
	3-aminofenyl-1-karbonitril	

4.3 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

4.3.1 Příprava chloridů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

0,0027 mol pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustila v 25 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. K roztoku se přidalo 0,073 mol (10 ml) thionylchloridu. Baňka byla opatřena zpětným chladičem a zahřívala se v olejové lázni k varu při teplotě 120 °C 1 hodinu. Poté se nezreagovaný podíl thionylchloridu oddestiloval za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Aby se oddestiloval všechen thionylchlorid z produktu, přidalo se na závěr malé množství toluenu pro azeotropní destilaci. Surový produkt v baňce se dále nečistil, ale použil se k následující reakci.

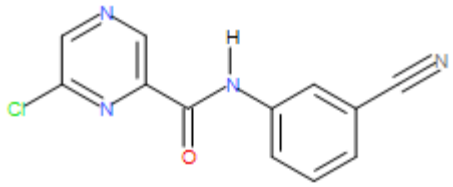
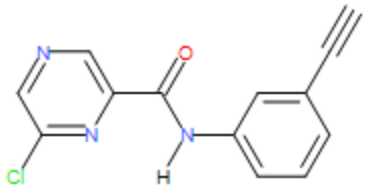
4.3.2 Příprava amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

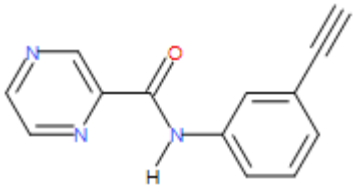
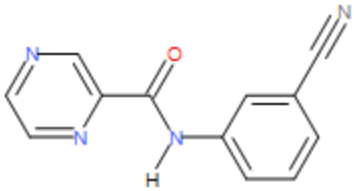
0,0027 mol substituovaného anilinu bylo rozpuštěno v cca 10 ml bezvodého acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku bylo přidáno 0,0027 mol (0,23 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce byl po kapkách přidáván roztok 0,0027 mol chloridu kyseliny pyrazin-2--karboxylové v bezvodém acetonu. Směs byla míchána asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté byl aceton oddestilován za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl překrystalizován ze směsi voda:ethanol. Případné následné přečištění bylo provedeno preparativní kapalinovou chromatografií.

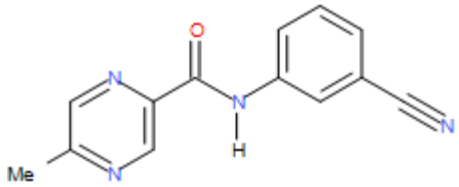
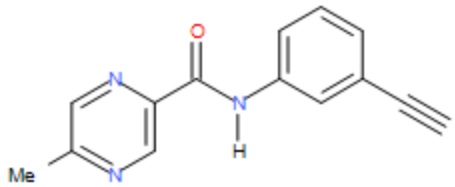
Následně se provedla kontrola průběhu reakce pomocí TLC za použití vyvíjecí soustavy toluen:aceton (1:1). Hned po reakci se změřila teplota tání získaného produktu.

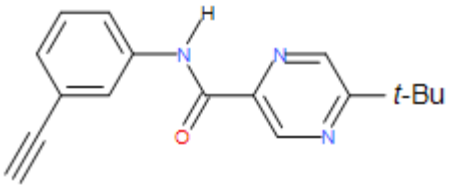
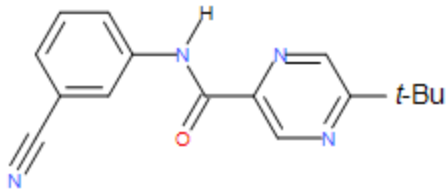
5 Výsledky

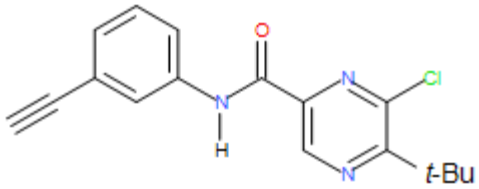
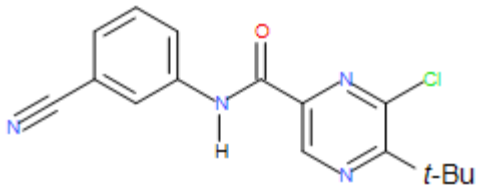
5.1 Charakteristiky připravených derivátů pyrazinu

Kód látky	**MD 473**	**MD 474**
		
Systematický název	6-chlor-*N*-(3-kyanfenyl)pyrazin--2-karboxamid	6-chlor-*N*-(3-ethynylfenyl)pyrazin--2-karboxamid
Sumární vzorec	$C_{12}H_7ClN_4O$	$C_{13}H_8ClN_3O$
Výtěžek, [%]	11,5	30,5
M. h., [g/mol]	258,67	257,68
Tt [°C]	145-147	143-146
RF	0,85	0,87
Elementární analýza teor.	C: 55,72 %; H: 2,73 %; Cl: 13,71 %; N: 21,66 %; O: 6,19 %	C: 60,60 %; H: 3,13 %; Cl: 13,76 %; N: 16,31 %; O: 6,21 %
Elementární analýza prakt.	C: 55,62 %); H: 2,68%); N: 21,80 %	C: 60,49 %; H: 3,02 %; N: 16,20 %;
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3330 (NH), 2231 (CN), 1693 (C=O), 1607 (fenyl), 1589 (NH), 1435, 1268, 1137 (pyrazin)	3352 (NH), 3281 (ethynyl), 1688 (C=O), 1586 (fenyl), 1535 (NH), 1429, 1283, 1170 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,96 (s, 1H, pyr.), 9,19 (s, NH), 8,78 (s, 1H, pyr.), 7,72, 7,62, 7,26, 7,22 (4H, arom.)	10,86 (s, 1H, pyr.), 9,20 (s, NH), 8,80 (s, 1H, pyr.), 7,78, 7,60, 7,46, 7,32 (4H, arom.), 3,41 (CH)
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]	162,45; 149,50; 147,32; 136,70; 133,42; 129,84; 128,66; 126,15; 123,36; 122,36; 118,05; 113,48	162,62; 146,21; 146,58; 144,32; 142,81; 135,90; 129,78; 129,22; 127,96; 126,80; 122,48; 82,90, 81,11

Kód látky	**MD 480**	**MD 481**
		
Systematický název	*N*-(3-ethynylfenyl)pyrazin--2-karboxamid	*N*-(3-kyanfenyl)pyrazin--2-karboxamid
Sumární vzorec	$C_{13}H_9N_3O$	$C_{12}H_8N_4O$
Výtěžek, [%]	79,4	52,7
M. h., [g/mol]	223,24	224,22
Tt [°C]	173-176	145-150
RF	0,71	0,73
Elementární analýza teor.	C: 69,95 %; H: 4,06 %; N: 18,82 %; O: 7,17 %	C: 64,28 %; H: 3,60 %; N: 24,99 %; O: 7,14 %
Elementární analýza prakt.	C: 70,08 %; H: 3,06 %; N: 19,11 %	C: 64,37 %; H: 3,58 %; N: 25,13 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3344 (NH), 3207 (ethynyl), 1698 (C=O), 1587 (fenyl), 1563 (NH), 1430, 1290, 1163 (pyrazin).	3294 (NH), 2232 (CN), 1680 (C=O), 1607 (fenyl), 1587 (NH), 1418, 1267, 1177 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,98 (s, 1H, pyr.), 9,13 (s, NH), 8,89 (s, 1H, pyr.), 8,82 (s, 1H, pyr.), 7,81, 7,58, 7,56, 7,29 (4H, arom.), 3,38 (CH)	10,98 (s, 1H, pyr.), 9,15 (s, NH), 8,89 (s, 1H, pyr.), 8,80 (s, 1H, pyr.), 7,82, 7,64, 7,36, 7,22 (4H, arom.)
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]	162,65; 146,20; 146,41; 144,20; 142,80; 135,92; 129,80; 129,20; 127,95; 126,80; 122,57; 82,91; 81,08	162,25; 149,38; 146,11; 138,97; 133,02; 129,14; 128,65; 126,87; 122,57; 122,13; 118,65; 112,95

Kód látky	**MD 500**	**MD 501**
		
Systematický název	*5-methyl-N*-(3-kyanfenyl)pyrazin--2-karboxamid	*5-methyl*--*N*-(3-ethynylfenyl)pyrazin--2-karboxamid
Sumární vzorec	$C_{13}H_{10}N_4O$	$C_{14}H_{11}N_3O$
Výtěžek, [%]	37,1	59,6
M. h., [g/mol]	238,09	237,09
Tt [°C]	173-179	124-127
RF	0,75	0,79
Elementární analýza teor.	C: 65,54 %; H: 4,30 %; N: 23,52 %; O: 6,72 %	C: 70,87 %; H: 4,67 %; N: 17,71 %; O: 6,74 %
Elementární analýza prakt.	C: 65,68 %; H: 4,32 %; N: 23,80 %	C: 71,02 %; H: 4,77 %; N: 18,08 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3344 (NH), 2997 (methyl), 2239 (CN), 1688 (C=O), 1588 (fenyl), 1548 (NH), 1485, 1292, 1147 (pyrazin)	3353 (NH), 3281 (ethynyl), 2968 (methyl); 1685 (C=O), 1584 (fenyl), 1535 (NH), 1429, 1283, 1172 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,91 (s, 1H, pyr.), 9,07 (s, NH), 8,90 (s, 1H, pyr.), 8,78 (s, 1H, pyr.), 7,84, 7,64, 7,38, 7,20 (4H, arom.), 1,36 (3H)	10,88 (s, 1H, pyr.), 9,21 (s, NH), 8,82 (s, 1H, pyr.), 7,76, 7,60, 7,48, 7,30 (4H, arom.), 3,41 (CH), 1,35 (3H)
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]	162,27; 149,27; 146,31; 139,27; 132,78; 129,04; 128,90; 126,88; 122,27; 122,03; 118,55; 113,42; 26,58	162,64; 146,20; 146,60; 144,29; 142,80; 135,89; 129,76; 129,20; 128,07; 126,82; 122,46; 82,91, 82,16, 26,38

Kód látky	**MD 586**	**MD 587**
		
Systematický název	5-*terc*-butyl- -*N*-(3-ethynylfenyl)pyrazin- -*2-karboxamid*	5-*terc*-butyl- -*N*-(3-kyanfenyl)pyrazin- -*2-karboxamid*
Sumární vzorec	$C_{17}H_{17}N_3O$	$C_{16}H_{16}N_4O$
Výtěžek, [%]	67,4	73,5
M. h., [g/mol]	279,34	280,32
Tt [°C]	152-153	189-191
RF	0,78	0,77
Elementární analýza teor.	C: 73,10 %; H: 6,13 %; N: 15,04 %; O: 5,73 %	C: 68,55 %; H: 5,75 %; N: 19,99 %; O: 5,71 %
Elementární analýza prakt.	C: 73,28 %; H: 6,25 %; N: 14,88 %	C: 68,81 %; H: 5,89 %; N: 20,16 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3365 (NH), 3280 (ethynyl), 2979, 2949, 2929 (*terc*-butyl); 1665 (C=O), 1585 (fenyl), 1535 (NH), 1430, 1281, 1142 (pyrazin)	3304 (NH), 2987, 2936, 2912, 2864, (*terc*-butyl), 2238 (CN) 1686 (C=O), 1593 (fenyl), 1553 (NH), 1481, 1249, 1173 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,88 (s, 1H, pyr.), 9,21 (s, NH), 8,82 (s, 1H, pyr.), 7,76, 7,60, 7,48, 7,30 (4H, arom.), 3,41 (CH), 1,35 (3H)	10,88 (s, 1H, pyr.), 9,09 (s, NH), 8,92 (s, 1H, pyr.), 8,78 (s, 1H, pyr.), 7,84, 7,64, 7,38, 7,20 (4H, arom.), 1,38 (9H)
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]	162,64; 146,20; 146,60; 144,29; 142,80; 135,89; 129,76; 129,20; 128,07; 126,82; 122,46; 82,91; 82,16; 26,38	162,25; 149,38; 146,11; 138,97; 133,02; 129,14; 128,65; 126,87; 122,57; 122,13; 118,65; 112,95; 26,65; 26,12; 25,98

Kód látky	MD 524	MD 525
		
Systematický název	5-*terc*-butyl-6-chlor- -*N*-(3-ethynylfenyl)pyrazin- -2-karboxamid	5-*terc*-butyl-6-chlor- -*N*-(3-kyanfenyl)pyrazin- -2-karboxamid
Sumární vzorec	$C_{17}H_{16}ClN_3O$	$C_{16}H_{15}ClN_4O$
Výtěžek, [%]	46,6	29,3
M. h., [g/mol]	313,79	314,78
Tt [°C]	138-140	127-130
RF	0,71	0,73
Elementární analýza teor.	C: 65,07 %; H: 5,14 %; Cl: 11,30 %; N: 13,39 %; O: 5,10 %	C: 61,05 %; H: 4,80 %; Cl: 11,26 %; N: 17,80 %; O: 5,08 %
Elementární analýza prakt.	C: 64,87 %; H: 5,04 %; N: 13,39 %	C: 60,87 %; H: 4,52 %; N: 17,52 %
IČ spektrum (KBr), [cm^{-1}]	3296 (NH), 3240 (ethynyl), 2975, 2960, 2934 (*terc*-butyl); 1663 (C=O), 1583 (fenyl), 1538 (NH), 1436, 1293, 1149 (pyrazin)	3345 (NH), 2977, 2938, 2912, 2874, (*terc*-butyl), 2231 (CN) 1688 (C=O), 1588 (fenyl), 1538 (NH), 1434, 1291, 1147 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]	10,88 (s, 1H, pyr.), 9,21 (s, NH), 7,76, 7,60, 7,48, 7,30 (4H, arom.), 3,41 (CH), 1,33 (9H)	10,98 (s, 1H, pyr.), 9,15 (s, NH), 8,89 (s, 1H, pyr.), 8,80 (s, 1H, pyr.), 7,82, 7,64, 7,36, 7,22 (4H, arom.), 1,37 (9H)
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]	162,65; 146,23; 146,48; 144,32; 142,80; 142, 68; 135,95; 129,80; 129,52; 128,10; 126,80; 122,66; 82,92, 82,10, 28,65, 28,04, 27,85	162,35; 149,50; 146,14; 138,99; 133,05; 129,15; 128,66; 126,88; 122,67; 122,14; 118,64; 112,92; 28,75; 28,02; 27,98

5.2 Log P, Clog P, log K

Kapacitní faktory K byly vypočítány pomocí programu Millennium32® Chromatography Manager Software podle vzorce $K = (T_R - T_D)/T_D$, kde T_R je retenční čas, kdy detekovaná látka dosáhne maxima píku, a T_D je mrtvý čas, který je charakterizován dobou mezi nástřikem a maximem píku nezadrženého analytu. K HPLC byly použity Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996 (Waters Corporation, Milford, MA, U.S.A.). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu p.a. A vody. Detekce probíhala spektrofotometricky při 210 nm. Log K je používán jako index lipofility.

Dále byly určeny hodnoty Clog P a log P pomocí programu CS ChemOffice Ultra verze 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A). Hodnota Clog P je rozdělovací koeficient oktanol/voda, při jehož určení jsou vzaty v potaz možné chemické interakce. Hodnota *log* P je rozdělovací koeficient v soustavě n-oktanol/voda. Hodnota lipofility je významný parametr pro predikci prostupu nově syntetizovaných látek přes mykobakteriální stěnu. Optimální hodnoty se u podobných pyrazinových derivátů připravených v minulosti pohybovaly v rozmezí log P = 2,0 – 3,0 [19].

Kód látky	**log *K***	**log *P*** ACD/Log P	**log *P* / Clog*P*** ChemOffice
MD 473	0.5007	2.36 ± 0.45	1.52 / 1.69639
MD 474	0.6233	2.44 ± 0.48	1.65 / 2.47619
MD 480	0.3564	1.32 ± 0.46	0.75 / 1.73448
MD 481	0.2667	1.24 ± 0.43	0.62 / 0.970735
MD 500	0.5867	1.36 ± 0.45	1.33 / 1.46974
MD 501	0.6122	1,86 ± 0.47	1.45 / 2.23348
MD 586	0.7954	3.01 ± 0.47	2.88 / 3.56048
MD 587	0.6759	2.93 ± 0.44	2.75 / 2.79673
MD 524	1.0559	4.13 ± 0.49	3.78 / 4.30219
MD 525	0.8841	4.05 ± 0.47	3.65 / 3.52239

5.3 Antifungální aktivita

Vykonal: Mgr. Vejsová M., Dufková I.

Testované látky

Kód látky	**m.h.**	**Kód látky**	**m.h.**
MD 473 – neúplně rozpust.v DMSO	258,67	MD 501	237,09
MD 474	257,68	MD 586	279,34
MD 480	223,24	MD 587	280,32
MD 481	224,22	MD 524	313,79
MD 500	238,09	MD 525	314,78

Médium: RPMI 1640 s glutaminem	pH / pufr: 7,0 / MOPS (0,165M)
Délka inkubace: 24 - 48h (u TM 48h-72h)	Teplota: 35°C

Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra

Odečítání: vizuální / fotometrické (OD 540nm); MIC = IC_{80} (80% inhibice kontroly)

Testované kmeny (kód, číslo)

1.**CA1** -*Candida albicans* ATCC 44859

2.**CT** -*Candida tropicalis* 156

3. **CK2** -*Candida krusei* E28

4. **CG** -*Candida glabrata* 20/I

5. **TB** -*Trichosporon beigelii* 1188

6. **AF** -*Aspergillus fumigatus* 231

7. **AC** -*Absidia corymbifera* 272

8. **TM** -*Trichophyton mentagrophytes* 445

Výsledky

KMEN		**TESTOVANÁ LÁTKA** (kód)										**Standart**
		MIC/IC_{80} (µmol.l^{-1})										
(kód)		**MD 473**	**MD 474**	**MD 480**	**MD 481**	**MD 500**	**MD 501**	**MD 586**	**MD 587**	**MD524**	**MD525**	**Ketoko-nazol**
CA1	24h	**62,5**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	**125**	>250	<0,24
	48h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	<0,24
CT	24h	**31,25**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	1,95
	48h	**62,5**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	3,91
CK2	24h	**62,5**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	**62,5**	>250	0,98
	48h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	1,95
CG	24h	**15,62**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	**62,5**	>250	0,49
	48h	**62,5**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	1,95
TB	24h	**31,25**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	<0,24
	48h	**125**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	<0,24
AF	24h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	**125**	>250	7,81
	48h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	7,81
AC	24h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	31,25
	48h	>125	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	31,25
TM	72h	**31,25**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	0,98
	120h	**125**	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>250	>125	>250	1,95

6 Diskuze

Potřeba nových antituberkulotik, která by měla výhodné farmakokinetické vlastnosti, byla vysoce účinná na citlivé i rezistentní kmeny *M. tb.*, bezpečná a zkracovala délku léčby, vedla i k hledání analogů PZA. Na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové bylo v minulosti připraveno mnoho sérií látek tohoto typu, u kterých se na aromatických jádrech vyskytovaly v různých polohách různé substituenty. Anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny, které byly připraveny v rámci této diplomové práce, jsou jen malou částí skupiny látek, kterými se tato katedra zabývá.

Vlastní syntéza u každé z těchto látek obnášela přípravu chloridu substituované pyrazin--2-karboxylové kyseliny a syntéza anilidu z příslušné kyseliny aminolýzou. Reakce probíhaly většinou hladce a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 11,5 – 79,4 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu. Čištění látek bylo prováděla rekrystalizací ze směsi ethanol/voda, případně pomocí HPLC.

Dále byly u látek zjištěny hodnoty lipofility Clog P a log P. Log P připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 1,24 – 4,13 a ClogP v rozmezí 0,62 – 3,78. Optimální hodnoty log P se u podobných pyrazinových derivátů připravených v minulosti pohybovaly v rozmezí log P = 2,0 – 3,0 [19]. Předpokládá se, že dostatečná lipofilita je jednou z důležitých a základních podmínek pro průnik přes vysoce lipofilní mykobakteriální stěnu. Ze získaných hodnot je patrné, že lipofilita stoupá s molekulovou hmotností. Další vliv na lipofilitu mají substituenty na pyrazinovém jádře – lipofilita roste od sloučenin bez substituce na pyrazinovém jádře přes substituované methylem, atomem chloru, *terc*-butylem k nejlipofilněším sloučeninám současně substituovaným atomem chloru a *terc*-butylem. Z porovnání dvojic látek (se stejnou substitucí na pyrazinovém jádře) z hlediska přítomnosti ethynylové či kyanoskupiny, lze dle očekávání pozorovat vyšší lipofilitu u látek s ethynylovou skupinou.

Nicméně po vyhodnocení biologického hodnocení in vitro na antifungální aktivitu, byla zjištěna určitá aktivita jen u dvou látek a to u MD 473 a MD 524. Látka MD 473 působila na kmeny *Candida albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. glabrata, Trichosporon beigelii a Trichophyton mentagrophytes,* ale méně než standart (ketokonazol). Látka MD 524 byla ještě méně účinná a jen na kmeny *C. albicans, C. krusei, C. glabrata a Aspergillus fumigatus.* To vypovídá o nízkém potenciálu těchto látek stát se novými antimykotiky.

Připravené sloučeniny byly odeslány na testování *in vitro* na účinnost proti

M. tuberculosis H37Rv v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility). Antimykobakteriální aktivita syntetizovaných látek bude testována na *M. tuberculosis* H37Rv v mediu BACTEC 12B použitím BACTEC 460 radiometrického systému. Výsledky biologického zkoušení na antimykobakteriální aktivitu nebyly v době odevzdání této práce k dispozici [20].

7 Závěr

Bylo připraveno deset nových látek, které byly charakterizovány teplotou tání, R_F, elementární analýzou, IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektry. Dále bylo u těchto látek vypočteno log P a ClogP: log P připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 1,24 – 4,13 a ClogP v rozmezí 0,62 – 3,78. Tyto látky byly podrobeny biologickému hodnocení *in vitro* na antimykobakteriální a antifungální aktivitu. Výsledky biologického zkoušení na antimykobakteriální aktivitu nebyly v době odevzdání této práce k dispozici a antifungální aktivita připravených látek nebyla dostatečná.

8 Literatura

[1] Emma C. Rivers, Ricardo L. Mancera. Trials with novel mechanisms of action. Drug Discovery Today, 2008, Vol. 13, No. 23/24

[2] Marcus Vinícius Nora de Souza. Promising Drugs Against Tuberculosis. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 2006, Vol. 1, No. 1, p. 33-44

[3] Doležal M., Hartl J., Miletín M. et al., Farmaceutická chemie IV., 2006, Vol. 53, p. 126, ISSN: electronic 1336-9075, print 0366-6352

[4] Ahmed Kamal, Shaik Azeeza, M. Shaheer Malik et al., Efforts Towards the Development of New Antitubercular Agents:Potential for Thiolactomycin Based Compounds, J Pharm Pharmaceut Sci, 2008, Vol. 11, No. 2: 56s-80s,

[5] Mikro -verze AISLP – ČR 2008.3 pro MS Windows

[6] Mary Margaret Wade, Ying Zhang. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against Mycobacterium tuberculosis in vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, Vol. 58, p. 936–941

[7] Ying Zhang, Mary Margaret Wade, Angelo Scorpio et al., Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, Vol.52, No.5, p. 790–795.

[8] Ying Zhang, Angelo Scorpio, Hiroshi Nikaido and Zhonghe Sun. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Pyrazinamide. Journal of bacteriology, 1999, Vol. 181, No. 7, p. 2044–2049

[9] Silvana C. Ngo, Oren Zimhony, Woo Jin Chung et al., Inhibition of Isolated Mycobacterium tuberculosis Fatty Acid Synthase I by Pyrazinamide Analogs. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2007, Vol. 51, No. 7, p. 2430–2435

[10] Pyrazinamide, Tuberculosis 2008, Vol. 88, No.2, p. 141–144

[11] Helena I. Boshoff, Valerie Mizrahi, Clifton E. Barry. Effects of Pyrazinamide on Fatty Acid Synthesis by Whole Mycobacterial Cells and Purified Fatty Acid Synthase I. Journal of bacteriology, 2002, Vol. 184, No. 8(2), p. 2167–2172

[12] C. Becker, J. B. Dressman, G.L. Amidon et al., Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Pyrazinamide. Journal of pharmaceutical sciences, 2008, Vol. 97, No. 9,

[13] Nováček L., Palát K., Čeladník M. Chem. Listy 1963, 57, 298.

[14] Bird C. W. Tetrahedron 1992, 48, 335.

[15] McCullough K. J. Pyrazines and Related Ring Structures. In: Ansell M. F. Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. 2nd Edition, Vol. IV, Elsevier, New York, 1995, p. 93-130.

[16] Brown D. J. The Pyrazines. J. Wiley and Sons, Inc., New York, 2002.

[17] Hrabálek A. a kol., Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty. Univerzita Karlova v Praze, Karolinum 1999, 170 stran, ISBN 80-7184-968-5

[18] Červinka O. a kol., Chemie organických sloučenin, 2. díl, 1. vydání. SNTL/ALFA, 1987

[19] Doležal M.; Hartl J.; Krinková J.; Odlerová Ž., Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinecarboxylic acid derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 1998, Vol. 23, No. 1, p. 51–58.

[20] http://www.taacf.org (staženo 14. 5. 2009)