Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Potenciální antituberkulotika ze skupiny substituovaných pyrazinů

rigorózní práce

Hradec Králové, 2006 **Mgr.Zuzana Röslerová**

Děkuji **Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D.**
za cenné rady a pomoc při vzniku této rigorózní práce.

OBSAH

1. ÚVODNÍ ČÁST 5

1.1. Tuberkulóza -úvod 5
1.2. Původce tuberkulózy 6
1.3. Tuberkulóza ve světě 6
1.4. TBC a HIV koinfekce 7
1.5. Prevence tuberkulózy 8
1.6. Léčba TBC 9

2. TEORETICKÁ ČÁST 25

2.1. Vlastnosti pyrazinového jádra 25
2.2. Příprava N- oxidů pyrazinu 28
2.3. Halogenace pyrazinového jádra 28
2.4. Příprava acylhalogenidů 29
2.5. Příprava anilidů karboxylových kyselin 29

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 31

3.1. Přístroje a chemikálie 31
3.2. Schéma prováděných reakcí 32
3.3. Příprava pyrazin-2-karboxylové kyseliny 33
3.4. Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny 33
3.5. Příprava 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny 34
3.6. Příprava 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny 34
3.7. Příprava 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 35
3.8. Příprava 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 35
3.9. Obecný postup přípravy anilidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny 36
3.10. Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky 38

1. 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny 38
2. 2-fluoranilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 39
3. 2-fluoranilid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny 40
4. 2-fluoranilid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 41
5. (4-merkaptofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny 42
6. (4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 43
7. (4-merkaptofenyl)amid 5-terc-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny 44
8. (4-merkaptofenyl)amid 5-terc-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny 45

4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ 46

4.1. Antituberkulotická aktivita 46
4.2. Antifungální aktivita 46
4.3. Herbicidní aktivita 48

5. DISKUSE 50

6. ZÁVĚR 54

7. PŘÍLOHA 55

8. SEZNAM LITERATURY 64

CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE

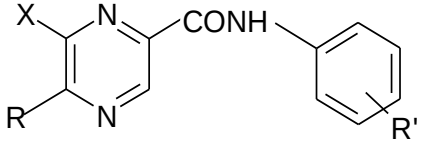
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem. Doplňkově je u nově připravených látek zjišťována jejich schopnost inhibovat fotosyntézu. Biologická aktivita připravených látek je studována ve spolupráci s americkým institutem TAACF (Tuberculosis Acquisition and Coordinating Facility; mezinárodní program pro testování nových antituberkulotik), Katedrou biologických a lékařských věd FaF v Hradci Králové a Chemickým ústavem Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě. Tato rigorózní práce je dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry.

Cílem této práce je pokusit se připravit biologicky (tj. antifungálně a především antimykobakteriálně) aktivní deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny. Tato práce navazuje na výsledky prezentované na fakultním kole Studentské vědecké konference v roce 2005[1] a na mou diplomovou práci z roku 2006.[2] Mé dílčí výsledky byly uvedeny v publikaci z roku 2004: Substituted Pyrazinecarboxamides.[3]

Konkrétními úkoly bylo:

1. Provést rešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě, trendy v terapii a potenciální antituberkulotika.
2. V dostupné chemické literatuře zjistit metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravit substituované amidy pyrazinkarboxylové kyseliny, ve kterých je připojený aromatický kruh v různých polohách substituován různými substituenty.
4. Vypočítat log *P* nově připravených derivátů.
5. Zjistit vliv substituce připojeného benzenového jádra na log *P*.
6. Zjistit vztah mezi strukturou, biologickým účinkem (antituberkulózní, antifungální, herbicidní aktivita) a lipofilitou v sérii připravených látek.

Obecný vzorec připravovaných látek:



X = H, Cl
R = H, *terc*-butyl
R´= 2-F, 4-SH

1. ÚVODNÍ ČÁST

1.1. Tuberkulóza - úvod

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění způsobené především bacily *Mycobacterium tuberculosis*, zřídka *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium africanum,* mezi „atypická“ mykobakteria jsou řazena *M. kansasii, M. avium intracellulare, M. ulcerans,* která jsou potenciálními oportunními patogeny.

Hlavním cílovým orgánem jsou plíce, ale mykobakterie mohou způsobovat i onemocnění v mimoplicních strukturách.

Rozdělení orgánového postižení podle posledních kritérií Světové zdravotnické organizace:

1. Plicní tuberkulóza je onemocnění, které postihuje plicní parenchym.
2. Mimoplicní (extrapulmonální) tuberkulóza je onemocnění, které postihuje mimoplicní struktury.
3. Pacient s plicní a mimoplicní formou TBC se řadí mezi plicní TBC. Pacient s více postiženými místy u mimoplicní TBC se zařazuje podle místa nejzávažnější formy postižení.

Nejčastějším zdrojem nákazy je člověk, méně často zvířata. Mykobakterie se šíří vzdušnou cestou a do organismu vstupují dýchacími cestami inhalací drobných kapének. Zřídka dochází k digestivnímu přenosu nebo přenosu kontaktem. Velmi vzácný je přenos hematogenní z matky na plod. Nejčastější vstupní branou je dýchací systém, o čemž svědčí i vysoký podíl plicní TBC, která tvoří 80 až 90 % všech forem TBC.

Tuberkulóza je specifické onemocnění, které je vzhledem na svoji osobitost a závažnost sledováno odděleně od ostatních infekčních chorob. Je sociální chorobou, a za zhoršení sociálně-ekonomických podmínek dochází vždy k vzestupu jejího výskytu. Optimistické prognózy, které vznikly v 80. letech 20. století na základě kontinuálního a pomalého poklesu incidence TBC, že do třetího tisíciletí vstoupíme bez tohoto onemocnění, jsou dnes značnou utopií. Světová pandemie AIDS, narkomanie, migrace obyvatel a stále špatná sociálně-ekonomická situace způsobila novou vlnu nárůstu TBC.[4]

1.2. Původce tuberkulózy

Primárním zdrojem nákazy je životaschopný tuberkulózní bacil *Mycobacterium tuberculosis.* Vyvinul se z půdní bakterie před více než 10 000 lety. Jde o pomalu rostoucí, aerobní, nesporulující, nepohyblivou, grampozitivní, acidorezistentní tyčku o velikosti 0,3 - 1,5 μm. Jako původce tuberkulózy byl objeven roku 1882 Robertem Kochem (tzv. Kochův bacil - BK). [5,6]

Obr. 1. Fotografie *M. tuberculosis*[7]

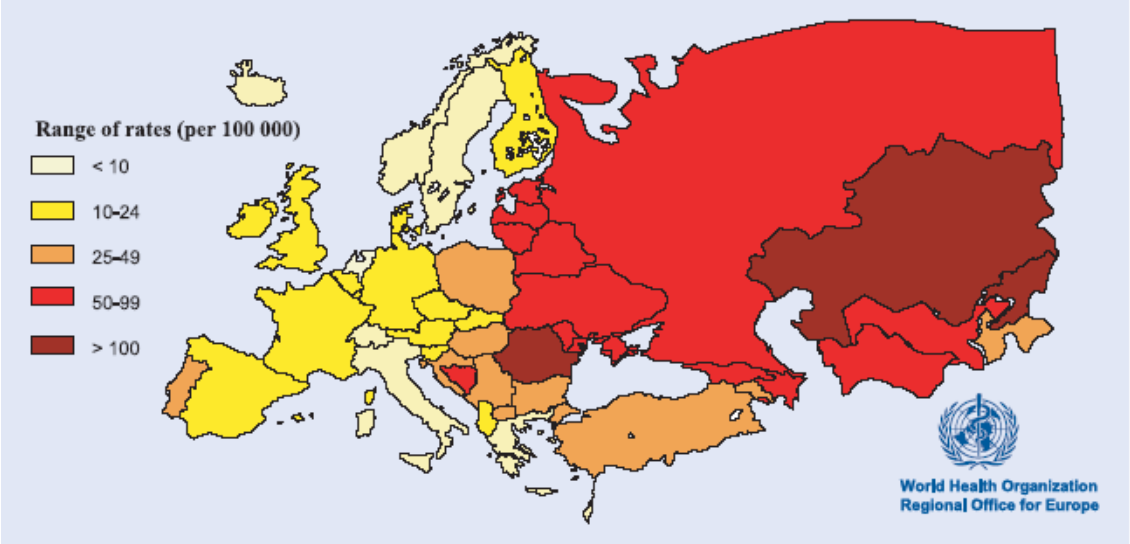
Buněčná stěna mykobakterií je silná a obsahuje velký podíl lipidních látek. Mimo obvyklých složek buněčné stěny, jako jsou lipidová dvojvrstva a peptidoglykan, obsahuje navíc vrstvu tvořenou dalšími polysacharidy, mykolovými kyselinami a acyllipidy, které znesnadňují průnik léčiv do mykobakterií. Stavba buněčné stěny je jedním z důvodů obtížné léčby TBC.[5]

1.3. Tuberkulóza ve světě

V současnosti je TBC rozšířena po celém světě a představuje jeden z největších zdravotních problémů lidstva. Podle údajů WHO je infikováno TBC více jak čtvrtina lidstva (1,86 miliardy lidí), ročně vzniká ve světě 8 miliónů nových případů, z toho 3,52 miliónů je mikroskopicky pozitivních, 10,7 miliónů je koinfikovaných TBC+HIV (0,18 % populace), 2,8 miliónů lidí ročně zemře na choroby přímo nebo nepřímo související s TBC.[4]

Do popředí se navíc dostává také problematika rezistentní TBC. Nové formy tuberkulózy se prudce rozšířily zejména v Africe. Ve světě se nyní ročně objeví na 450.000 nových případů tuberkulózy, jejíž bacily jsou multirezistentní. Takové bacily odolávají léčbě nejméně dvěma typy léků podávaných dříve pacientovi. WHO je obzvláště znepokojena tím, že se nedávno objevily případy tuberkulózy, jejíž bacily jsou ultrarezistentní, tedy na ně nemá žádný účinek léčba nejméně třemi ze šesti skupin léků předepisovaných v případě, že pacient nereaguje na počáteční léčbu.[8]

Obr. 2. Incidence TBC 2002 – Evropa[4]



V roce 1993 WHO vyhlásila všeobecný nouzový stav ohrožení TBC. Už 2 roky předtím vznikla mezinárodní doporučení strategie léčby TBC - tzv. DOTS (direct observation of treatment, short course - léčba pod přímým lékařským dohledem) jako reakce WHO na narůstající celosvětovou incidenci TBC. Je to základ STOP TB kampaně WHO. Je založena na šestibodové strategii:

1. zainteresování vlád v kontrole TBC
2. pravidelná dodávka antituberkulotik, která jsou pro pacienta bezplatná
3. vyhledávání případů, které je založené na mikroskopickém vyšetření sputa
4. terapie poskytovaná pod přímým dohledem
5. trénink zdravotnických pracovníků
6. audit účinnosti kontrolního programu

Podle údajů WHO Mezinárodní unie boje proti tuberkulóze a plicním chorobám za posledních 10 let vzniklo ve světě 88 mil. nových případů TBC.[4]

1.4. TBC a HIV koinfekce

Po problémech s multirezistentními kmeny *M. tuberculosis* se světová pozornost upíná také na problém koinfekce TBC a HIV. TBC je nejčastější příčinou smrti u pacientů s HIV infekcí (30 %). HIV je nejčastějším rizikovým faktorem aktivující TBC u lidí s infekcí *M. tuberculosis* a zvyšuje výskyt TBC buď endogenní reaktivací nebo exogenní reinfekcí. Zvyšování TBC případů s HIV/TBC koinfekcí zvyšuje riziko

přenosu TBC do společnosti. Zároveň tato koinfekce zvyšuje letalitu TBC v důsledku imunodeficience u těchto pacientů.

U osob, kteří jsou infikovaní *M. tuberculosis* je 10 - 20 % celoživotní riziko rozvinutí TBC. U pacientů HIV/TBC koinfikovaných toto riziko stoupá ročně o 10 %. Pravděpodobnost propuknutí TBC u HIV pozitivních lidí v Americe je 30 - 40 %, přičemž přežívání po nákaze HIV je 6 - 10 let.[4]

1.5. Prevence tuberkulózy

Prevence TBC spočívá v zachování těchto opatření: izolovat zdroj nákazy, BCG vakcinace, chemoprofylaxe, RTG depitáž, bakteriologická depitáž a zdravotnická výchova.

Izolování nákazy

Jde o klíčový problém a představuje v první fázi onemocnění hospitalizaci postižených. Důležitá je zejména ochrana dětí před infekcí. TBC dětí se vyskytuje přibližně v 50 % v rodinách s TBC. Významný vliv na to má např. péče o vnoučata starými rodiči trpícími na TBC.

Očkování proti tuberkulóze – kalmetizace

Podstatou toho očkování je aktivní imunizace organismu proti TBC. Francouzští mikrobiologové L.C.A. Calmette a C. Guérin v Pasteurově institutu v Paříži od r. 1906 přeočkovávali v 3-týdenních intervalech bovinní typ mykobakterie (*M. bovinum*) v 231 subkulturách, až získali kmen, který měl výrazně sníženou virulenci, ale zachovanou imunizační schopnost. Podávání BCG vakcíny, který získali z tohoto kmenu (BCG =Bacillus Calmette – Guerin), je základním postupem na vyvolání imunizace. Umožňuje fixovat tuberkulózní mykobakterie v místě jejich vniknutí do organismu, proto se uplatňuje jako ochranný činitel proti TBC infekci.

BCG vakcína se podává intradermálně do ramene, očkuje se od 4. dne do 6. týdne života v případě, že novorozenci mají porodní hmotnost vyšší než 2500 g. Přeočkování se provádí v 11 letech, pokud mají negativní tuberkulinovou reakci. Pokusy s vynecháním kalmetizace vedly k nárůstu incidence TBC.

Chemoprofylaxe

Chemoprofylaxe spočívá v podávání antituberkulotika INH v dávce 300 mg/den spolu s pyridoxinem, nejdéle 6 měsíců u osob, které jsou ohrožené TBC, aby nevzniklo manifestované onemocnění (např. děti v kontaktu s aktivní TBC). V menší míře se podává také rifampicin.

Rtg depitáž

Rtg depitáž znamená zhotovování rtg snímků hrudníku v rizikových skupinách obyvatelstva (imunosuprimovaní pacienti, alkoholici apod.).

Bakteriologická depitáž

Jedná se o vyšetření sputa na přítomnost *M. tuberculosis* u osob s překonanou TBC, pokud jsou podezřelí na recidivu.

Zdravotní výchova

Nedostatečná informovanost pacientů o nemoci a neznalost potřeby důsledné a dostatečně dlouhé léčby může vést k selhání léčby. Svědčí o tom vznik multirezistentních kmenů mykobakterií v mnohých částech světa (nedostatečné dávkování, předčasné ukončení léčby).[4]

1.6. Léčba TBC

Cílem léčby tuberkulózy je vyléčení nemocného TBC, prevence následků a úmrtí, prevence relapsu onemocnění a zamezení přenosu TBC na osoby, které byly a nebo jsou v kontaktu s nemocným.

Kauzální léčbou TBC je podávání antituberkulotik, antibiotik a chemoterapeutik působících na původce onemocnění. Další léky a léčebné postupy ustoupily do pozadí a používají se jen jako podpůrná léčba nebo jen ve výjimečných případech. Kombinace s chirurgickou léčbou probíhá ve spolupráci s příslušným odborníkem (urologem, ortopedem, gynekologem apod.)

1.6.1. Charakteristika antituberkulotik

Antituberkulotika mají v různé míře zastoupené 3 vlastnosti: baktericidní schopnost, schopnost sterilizace prostředí a schopnost prevence vzniku rezistentních mykobakterií.

Antituberkulotika dělíme na hlavní a vedlejší. **Mezi hlavní antituberkulotika (antituberkulotika I. řady) patří:** isoniazid (INH), rifampicin (RMP), streptomycin, pyrazinamid (PZA) a ethambutol. Při selhání terapie těmito léky (z důvodu rezistence, jejich kontraindikací nebo výrazných nežádoucích účinků) se v léčebných režimech sahá po rezervních lécích tzv. **antituberkulotika II. řady:** paraaminosalicylová kyselina, makrolidy, cykloserin, klofazimin, fluorochinolony (ofloxacin, ciprofloxacin), tionamidy (ethionamid, propionamid), aminoglykosidy (kanamycin, amikacin), deriváty

rifamycinu (rifabutin, rifapentin). Tyto látky jsou však méně efektivní a mají více nežádoucích účinků.

Při všech léčebných režimech se uskutečňuje terapie ve 2 fázích, v úvodní a pokračovací fázi.

1. Úvodní fáze (iniciální, intenzivní, útočná) při které se aplikují léčiva denně, přičemž se podávají čtyři až pět kombinací současně. Cílem úvodní fáze je rychlá redukce počtu choroboplodných zárodků, zabránění vzniku rezistentních kmenů. Tato fáze trvá zpravidla 2 měsíce. Pro možnost poškození různých orgánů při masivním podávání léků je potřebné sledovat biochemické ukazatele, zrak, sluch apod., a proto se má útočná fáze uskutečnit v rámci ústavní léčby.

2. Pokračovací fáze (preventivní, sterilizační) bezprostředně navazuje na iniciální fázi. V jejím průběhu se pacientovi ambulantně podávají dvě až tři kombinace léčiv. Cílem této fáze je dosáhnout sterilizačního efektu, eliminace reziduí, zabránění množení se malému počtu mykobakterií, které po intenzivní fázi ještě přetrvávají v tuberkulózních ložiskách (tabulka 1).[4]

Tabulka 1. Doporučené léčebné režimy podle diagnostikované TBC[4]

Kategória	Pacienti	Iniciálna fáza	Pokračovacia fáza
I	a) novozistená pľúcny TBC BK + b) novozistená pľúcna TBC BK – s rozsiahlym RTG nálezom c) novozistená ťažká forma mimopľúcnej TBC	HRZE(HRZS) 2 mesiace	HR 4 mesiace alebo HE 6 mesiacov
II	BK + zo spúta: a) recidíva b) zlyhanie liečby c) liečba po prerušení	HRZES 2 mesiace	HRE 5 mesiacov
III	a) novozistená pľúcny TBC BK- b) novozistená mimopľúcna BK – (menej závažné formy)	HRZ 2 mesiace	HR 4 mesiace alebo HE 6 mesiacov
IV	Chronické prípady (t.j. BK+aj po liečbe II. kategórie	Liečba v špecializovaných centrách, 4-6 kombinácia podľa citlivosti, aj AT II. radu	
H – izoniazid, R – rifampicin, S – streptomycín, Z – pyrazinamid, E – etambutol			

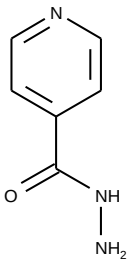
V případě, že pacient léčený režimem I. nebo II. kategorie zůstává i po dvou měsících pozitivní BK, prodlužuje se iniciální kontrolovaná léčba ještě o jeden měsíc léčby základní kombinací příslušící danému léčebnému režimu. Léčebný režim je považován za účinný pokuď % recidiv po třech letech nepřesáhne 3 %. Znakem účinné

terapie je snižování počtu bacilů ve sputu a zlepšení stavu pacienta jak klinicky tak rentgenologicky. Pokud je jistota, že pacient užívá léky správně a po 5 až 6 měsících nedošlo ke změně sputa, je vysoká pravděpodobnost rezistence mykobakterií na všechna podávaná antituberkulotika.

1.6.2. Antituberkulotika I. řady

Následující účinné látky se standardně používají v terapii tuberkulózy.[5,9,10]

Isoniazid



Charakteristika

Isoniazid je základní antituberkulotikum s významnou účinností. Je součástí prakticky všech léčebných režimů tuberkulózy jak pro svou účinnost, tak pro snadnou a levnou výrobu. Používá se v kombinacích s dalšími antituberkulotiky v terapii plicní i mimoplicní TBC, dále k chemoprofylaxi plicní tuberkulózy.

Mechanismus účinku

Jedná se o proléčivo (aktivován pomocí mykobakteriální katalasy), inhibuje biosyntézu mykolových kyselin buněčné stěny (napadá enzym mykolátsyntetasu, který je specifický pro mykobakterie).

Má baktericidní působení na množící se bakterie, bakteriostatický účinek na klidová stádia.

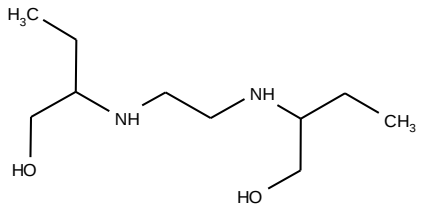
Nežádoucí účinky

Významné jsou toxické účinky na periferní a centrální nervový systém, kterým se předchází podáváním pyridoxinu (15 - 50 mg denně), dále hepatotoxicita (riziko hepatitid je vyšší u pacientů nad 35 let a u pomalých acetylátorů - pomalejší odbourávání hepatotoxických metabolitů), při současném požívání alkoholu nebezpečí disulfiramové reakce. Dalšími nežádoucími účinky jsou nauzea, zvracení, přecitlivělost, alergie.

Použití

Isoniazid je vysoce účinný na *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum* a *M. microti*). V kombinacích k léčbě atypických TBC, dříve léčba lepry (*M. leprae*).

Ethambutol



Charakteristika

Ethambutol je syntetický aminoalkohol. Jedná se o opticky aktivní sloučeninu se dvěma izolovanými chirálními atomy uhlíku. Účinný je pouze pravotočivý *S,S*-(+)-izomer, zatímco levotočivý izomer je inaktivní a jeho další stereoizomery jsou toxické (*R,R*-izomer může způsobit slepotu).

Mechanismus účinku

Mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny polymerizací arabinosy v buněčné stěně mykobaktéria (místem účinku je arabinofuranosyltransferasa, jež katalyzuje biosyntézu lipoarabinomannanu, nezbytného pro zachování integrity mykobakteriální stěny). Na účinku se zřejmě projevuje chelatační schopnost této látky. Má bakteriostatické působení proti většině mykobakteriím.

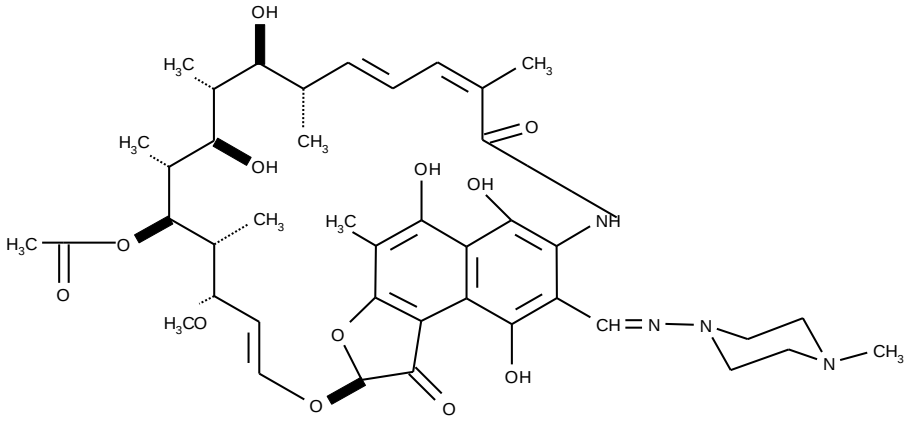
Nežádoucí účinky

Z nežádoucích účinků se může objevit kožní alergická reakce, neuritida zrakového nervu až poškození sítnice, která ustupuje po vysazení etambutolu, dále hyperurikémie.

Použití

Používá se zejména v případech, kde na kombinaci isoniazid/rifampicin/pyrazinamid vznikla na jednu z těchto složek rezistence. Dále k léčbě infekce vyvolané *M.avium* komplexem u pacientů se syndromem získané imunodeficience.

Rifampicin



Charakteristika

Rifampicin je ansamycinové baktericidní antibiotikum odvozené od rifamycinu B, který byl izolován ze *Streptomyces mediterrani*. Vyznačuje se velmi širokým spektrem účinku zahrnujícím grampozitivní, gramnegativní, aerobní i některé anaerobní mikroorganismy, chlamydie a rickettsie. Rifampicin působí baktericidně na dělící se i na klidová stádia mykobakterií.

Mechanismus účinku

Inhibuje prokaryotickou DNA-dependentní RNA polymerasu, (enzym nutný pro syntézu RNA), působí baktericidně i na klidová stádia mykobakterií (sterilizující účinky).

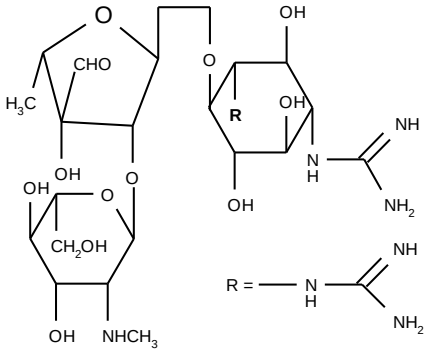
Nežádoucí účinky

Ojediněle se vyskytují vyrážky, trombocytopenie, nefritidy, poruchy jaterních funkcí, neškodné oranžové zbarvení moči, potu a slz.

Použití

Používá se v kombinaci s jinými antituberkulotiky (především isoniazidem nebo ethambutolem) k léčbě všech forem a stádií tuberkulózy. Může být použit i při atypické tuberkulóze a onemocnění leprou v kombinaci především s isoniazidem.

Streptomycin



Charakteristika

Streptomycin je aminoglykosidové antibiotikum izolované v roce 1944 ze *Streptomyces griseus*, v současné době používané pouze k terapii TBC. Vzhledem ke značnému nárůstu rezistence se používá výhradně v kombinaci s dalšími antituberkulotiky a některými autory již není řazen mezi antituberkulotika první řady. Je značně toxický, po perorálním podání se nevstřebává.

Mechanismus účinku

Antibakteriální účinek streptomycinu je dán inhibicí proteosyntézy. Vyvolává poruchy dekódování mRNA vazbou na 30 S ribosomy. To vede k inkorporaci nesprávných aminokyselin do polypeptidového řetězce a tím ke znehodnocení syntetizované bílkoviny. V nižších koncentracích je efekt bakteriostatický, při použití vyšších koncentrací vadně nasyntetizované bílkoviny způsobí zvýšení permeability buněčné membrány, efekt je baktericidní.

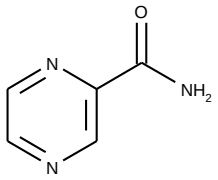
Nežádoucí účinky

Nejvážnějšími nežádoucími účinky jsou ototoxicita a nefrotoxicita. Streptomycin působí toxicky na VIII. hlavový nerv, *nervus statoacusticus*. Poškození se projevuje nejprve postižením vestibulárního aparátu a může končit až hluchotou, při které však pacient navíc vnímá rušivé šelesty. Dále může streptomycin způsobit kožní alergické reakce, neutropenii, trombocytopenii, agranulocytózu.

Použití

Používá se výhradně v kombinaci s dalšími antituberkulotiky, dále také k léčbě bakteriální endokarditidy, brucelózy a tularémie. Aplikace je i.m., popř. intrathekální.

Pyrazinamid (amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny)[11]



Charakteristika

Pyrazinamid je významné léčivo, které spolu s isoniazidem a rifampicinem tvoří základ moderní terapie TBC. Pyrazinamid umožňuje zkrátit dobu terapie TBC z původních 9 - 12 měsíců na 6 měsíců, protože usmrcuje v ložisku spící mykobakterie. Pyrazinamid se vyznačuje neobvyklými vlastnostmi. Je aktivní v kyselém prostředí kaseózních ložisek (pouze v kyselém pH dochází k hromadění pyrazin-2-karboxylové kyseliny, aktivní formy parazinamidu). Pozoruhodná sterilizující aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis* však nebyla pozorována za podmínek blízkým neutrálnímu pH. Působí tedy tam, kde jsou ostatní léčiva neúčinná. Odlišná antibiotika jsou účinná proti rostoucím aktivním mykobakteriím, naopak pyrazinamid je proti rostoucím mykobakteriím méně účinný, ale je více účinný proti starým nerostoucím mykobakteriím.

Mechanismus účinku

Uplynulo již více než 50 let od objevení této sloučeniny, ale mechanismus účinku je narozdíl od ostatních antituberkulotik méně znám. Pyrazinamid je proléčivo, které je bakteriální nikotinamidasou/pyrazinamidasou přeměněn na aktivní pyrazin-2-karboxylovou kyselinu. *M. tuberculosis* se vyznačuje vysokou vnímavostí vůči pyrazinamidu, neboť postrádá eflux pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Zatímco přirozeně rezistentní *M. smegmatis* má vysokou schopnost rychle vylučovat pyrazin-2-karboxylovou kyselinu z buňky ven.

Bylo pozorováno, že za přítomnosti pyrazin-2-karboxylové kyseliny v kyselém prostředí je významně redukován uptake uracilu a methioninu, čímž dochází ke snížení syntézy RNA a proteinů. Inhibicí syntézy RNA a proteinů a uptake serinu dochází k narušení membránového potenciálu, který je nutný pro membránový transport. Cílovým místem působení pyrazinamidu a pyrazin-2-karboxylové kyseliny je tedy buněčná membrána, ve které dojde k narušení její funkce a membránového transportu.

Kyselé pH je nezbytné pro aktivitu pyrazinamidu. Ve dřívějších studiích byla ukázána role kyselého pH, které usnadňuje vytváření protonizované pyrazin-2-karboxylové kyseliny, její průnik skrz membránu a následnou kumulaci aniontů a kationtů kyseliny uvnitř v buňce.

Ve studii uvedené v časopise JAC[11] je popsán ještě další význam kyselého pH, které potencuje účinek pyrazinamidu a jeho schopnost snižovat membránový potenciál v jiných bakteriích. Tento fakt nebyl v kontextu s pyrazinamidem dříve pozorován, až do té doby než bylo poukázáno na schopnost pyrazinamidu snižovat membránový potenciál. Pyrazinamid je více aktivní proti starým bakteriím, než proti čerstvým mladým bakteriím. Zkracuje dobu terapie TBC schopností zabíjet nereplikující „polospící" bakterie v kyselém prostředí. Provedená studie poskytuje věrohodné vysvětlení. Staré nebo „polospící" bakterie nemají aktivní metabolismus a ztrácejí zásoby energie, tím dochází ke snižování membránového potenciálu. Nízký membránový potenciál ve starých a nereplikujících mykobakteriích spolu s deficitem mechanismu efluxu pyrazin-2-karboxylové kyseliny a dále s relativně nízkou schopností udržovat membránový potenciál tvoří slabinu (Achilovu patu) pro atak pyrazin-2-karboxylovou kyselinou v kyselém prostředí. Buňky pak zanikají na základě poškození membránového potenciálu, nikoliv na pH gradient. Membránový potenciál je totiž nutný pro syntézu ATP F_1F_0ATPasou, výsledkem je pak pokles syntézy ATP ve starých a spících mykobakteriích, které již samotné mají nízkou zásobu energie.

Nežádoucí účinky

Hlavním nežádoucím účinkem je hepatotoxicita, léková horečka a hyperurikémie. Riziko poškození závisí na dávce a době podávání. Dále může způsobit nauzeu a zvracení, bolesti hlavy a žaludku, nespavost, závratě nebo alergické kožní reakce.

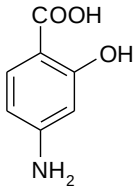
Použití

Pyrazinamid se používá v iniciální fázi TBC. Jeho podání zkracuje celkovou dobu léčby.[5]

1.6.3. Antituberkulotika II. řady

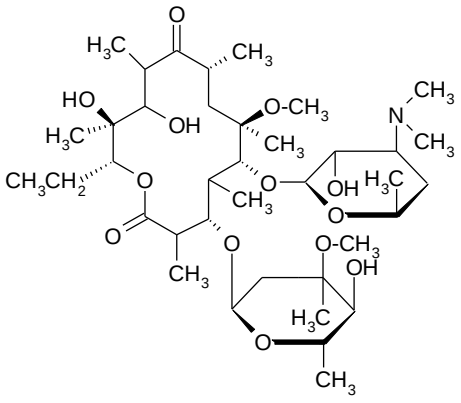
Mezi antituberkulotika II. řady se zařazují sloučeniny, které se používají v léčbě mykobakterióz, popř. při vzniku rezistence na antituberkulotika I. řady. Tyto látky jsou však méně efektivní a mají více nežádoucích účinků.

Paraaminosalicylová kyselina



PAS představuje chemoterapeutikum, které je chemicky blízké sulfonamidům. Mechanismus účinku není zcela vyjasněn, předpokládá se určitý vliv na salicylát-dependentní biosyntézu. Podává se p.o. ve vysokých dávkách (8 - 12 g denně). Takto vysoké dávky jsou špatně snášeny. Poměrně často se objevuje anorexie, nauzea, pálení v epigastriu, vzácně peptické vředy. Vysoké koncentrace v moči mohou vést ke krystalurii (nutná alkalizace moči). Mezi další nežádoucí účinky patří hypersenzitivita (př. vyrážky). PAS je příležitostně využívána pro terapii tuberkulózy způsobené multirezistentními kmeny mykobakterií.[5]

Makrolidy



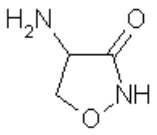
klaritromycin

Makrolidy jsou skupina antibiotik odvozených od erytromycinu (základem struktury je 14-členný makrocyklický lakton s připojenými cukernými zbytky). Novější deriváty se od erytromycinu liší ve velikosti a substituci laktonového kruhu (př. klaritromycin, roxitromycin, azitromycin, rokitamycin a spiramycin).

Mechanismem účinku je inhibice bakteriální proteosyntézy (vazbou na 50S podjednotku ribosomu způsobují disociaci peptidyl t-RNA). Podávají se stejně jako PAS p.o. ve vysokých dávkách (8 - 12 g denně), s čímž souvisí i podobné nežádoucí účinky (nauzea, zvracení, průjem…).

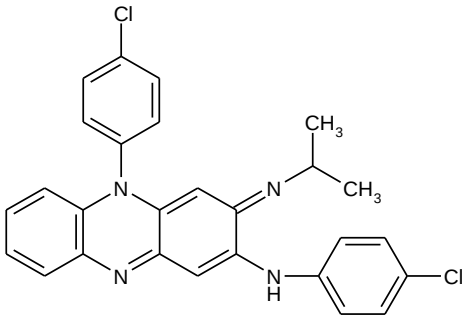
Jedná se o širokospektrá antibiotika inhibující růst mykobakterií, avšak žádné z nich nevykazuje dostatečně vysokou antituberkulotickou aktivitu. Při monoterapii dochází ke vzniku rezistence, proto se doporučuje používat je v kombinacích.[5,9]

Cykloserin



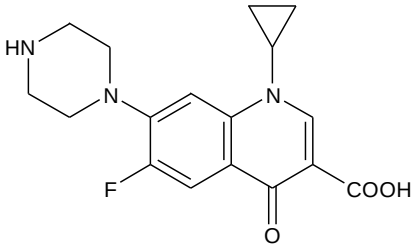
Cykloserin představuje strukturní analog aminokyseliny *D*-alaninu se širokým antibakteriálním účinkem včetně inhibice *M. tuberculosis*. Blokuje biosyntézu peptidoglykanu inhibicí enzymu *D*-alanin racemasa a *D*-alanin synthetasa. Má značně omezené použití pro závažné nežádoucí účinky v CNS.[5]

Klofazimin

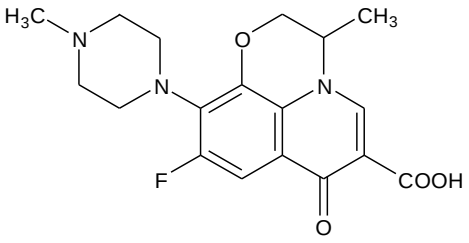


Klofazimin představuje derivát iminofenazinu. Má vysokou schopnost hromadit se v monocytech, navíc má i protizánětlivý účinek. Toto baktericidní chemoterapeutikum je velmi dobře rozpustné v tucích a má proto velmi dlouhý biologický poločas (70 dnů).Vyznačuje se incidencí rezistence. Účinkuje především proti lepře, uplatňuje se i v terapii některých mykobakterióz způsobených *M. intracellulare.*[5,10]

Fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin)



ciprofloxacin

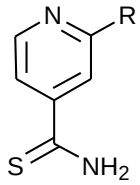


ofloxacin

Fluorochinolony představují syntetické deriváty kyseliny nalidixové. Mechanismus účinku chinolonových antibakteriálních látek spočívá v inhibici specifické bakteriální gyrasy. Celkově jsou snášeny poměrně dobře, z nežádoucích účinků se častěji vyskytují nauzea, zvracení, průjem, bolesti hlavy, vzácně fotosenzitivita, nervové a psychické poruchy, záněty šlach a srdeční arytmie.

Ciprofloxacin a ofloxacin mají široký antimykobakteriální účinek, zejm. proti *M. tuberculosis* a *M. avium.*[5]

Thionamidy (ethionamid, protionamid)



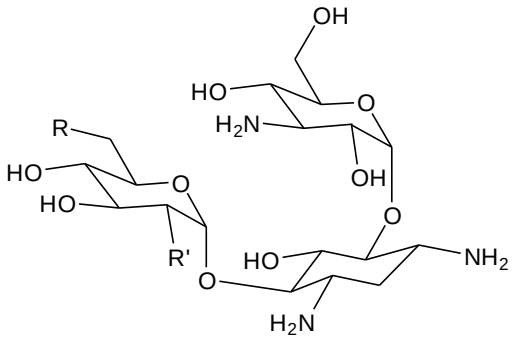
ethionamid (R= ethyl)

protionamid (R= propyl)

Ethionamid a protionamid se řadí mezi thioamidy kyseliny isonikotinové. Jejich účinek spočívá v inhibici syntézy mykolových kyselin v buněčné stěně mykobakterií. Jedná se o relativně toxická bakteriostatická antituberkulotika, od jejichž používání se ustoupilo v 70. a 80. letech dvacátého století. Mají omezený význam při léčbě plicní a mimoplicní TBC, u níž se podávají vždy v kombinaci s jinými antituberkulotiky. Ethionamid se používá v případě rezistence na antituberkulotika I. řady, a rovněž v terapii proti *Mycobacterium avium* komplexu u pacientů se syndromem získané imunodeficience v případě rezistence na léčiva první volby.[10]

Aminoglykosidy (kanamycin, amikacin)

Kanamycin

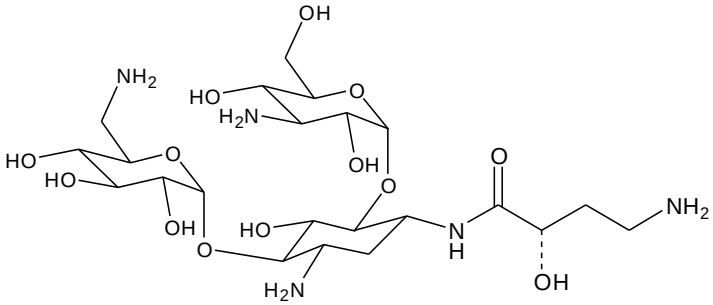


	R	R'
Kanamycin A	NH_2	OH
Kanamycin B	NH_2	NH_2
Kanamycin C	OH	NH_2

Kanamycin je antibiotikum izolované ze *Streptomyces kanamyceticus*. Je to poměrně silná baze, používá se ve formě síranu. Velmi málo se vstřebává po perorální aplikaci. Chemicky se jedná o směs převážně tří látek: kanamycinu A,B a C, které se liší počtem, resp. polohou aminoskupin na jedné cukerné složce.

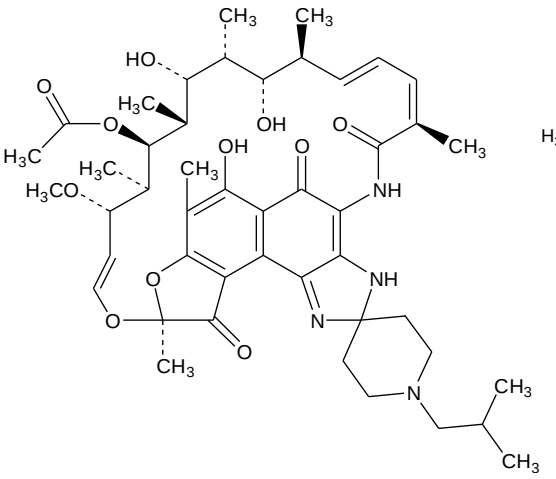
V komerčně dostupných přípravcích převažuje nejméně toxický kanamycin A. Mechanismus účinku a nežádoucí účinky jsou obdobné jako u streptomycinu.[10]

Amikacin

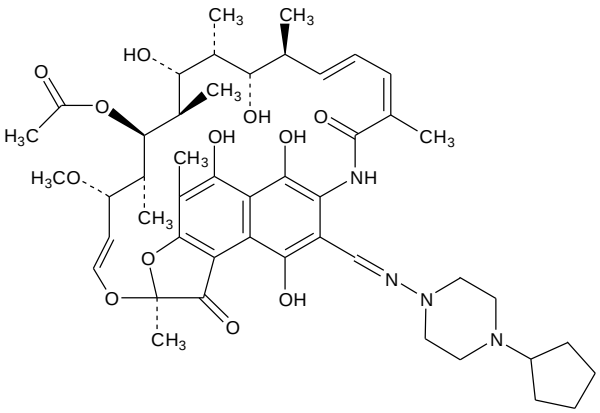


Od kanamycinu je odvozený jeho polysyntetický derivát amikacin [(1-*N*-4-amino-2-hydroxybutyryl)kanamycin A]. Tato chemická modifikace vede k chránění místa molekuly nejrychleji napadaného bakteriálními inaktivačními enzymy a díky tomu má amikacin prodloužený biologický poločas a je účinný i proti bakteriím rezistentním na ostatní aminoglykosidová antibiotika. Je také méně ototoxický, ale bohužel má nižší antibakteriální aktivitu (je potřeba velmi vysokých dávek), což značně limituje jeho terapeutické využití.[10]

Deriváty rifamycinu (rifabutin, rifapentin)



rifabutin



rifapentin

Jedná se o nejdůležitější skupinu antibakteriálních ansamycinů izolovaných 1959 z *Norcardia mediterrani*. Je to směs látek, označovaných jako rifamyciny A-E, z nichž nejdůležitější je rifamycin B. Není sice přímo vhodný pro terapeutické použití, ale stal se základem pro přípravu polosyntetických derivátů, které dnes mají významnou pozici, především v terapii TBC. Prvním polysyntetickým derivátem využívaným klinicky byl rifampicin, uvedený na trh v roce 1952. Dodnes představuje léčivo první volby v terapii mykobakteriálních infekcí (viz. výše). Novější rifamyciny byly do klinické praxe zavedeny až asi 25 let po rifampicinu. V současné době se terapeuticky využívají rifabutin a rifapentin. Jsou účinnější a mají delší biologický poločas a tedy jednodušší dávkování. Bohužel mezi všemi rifamyciny existuje zkřížená rezistence.[10]

1.6.4. Látky ve vývoji

V současnosti jsou vyvinuty nové látky, od kterých se očekává významnější změna v terapii TBC, řadíme sem:[12]

moxifloxacin - probíhá již klinické zkoušení

SQ-109 (nová generace etambutolu) - přechází do klinické fáze testování

diarylchinolony - přechází do klinické fáze

PA-824 (nitroimidazoly) - v preklinické fázi zkoušek

❖ **Fluorochinolony (moxifloxacin)**

Jedná se syntetické deriváty kyseliny nalidixové. V terapii se v současnosti používají jako antituberkulotika druhé řady ciprofloxacin a ofloxacin.

Vlastnosti*:* bez zkřížené rezistence s ostatními antituberkulotiky,
obykle se používají v terapii TBC způsobené multirezistentními kmeny mykobakterií.

Relativní antituberkulotická aktivita fluorochinolonů:

nejvyšší: gatifloxacin, moxifloxacin a sparfloxacin

střední: levofloxacin

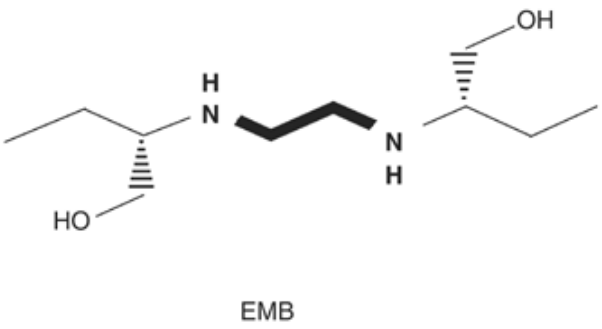
nižší: ciprofloxacin, ofloxacin

Tabulka 2. Charakteristické rysy fluorochinolonů:

Léčivo	Biologický poločas (h)	MIC (μmol/l)	Peak v séru po p.o. podání(h)
ciprofloxacin 750	4	2,0	2,3
ofloxacin 400	7	2,0	4,6
levofloxacin 500	7	1,0	6,0
sparfloxacin 400	20	**0,5**	1,3
gatifloxacin 400	7	**0,5**	4,4
moxifloxacin 400	12	**0,5**	4,5

❖ **Nová generace etambutolu (SQ-109)**

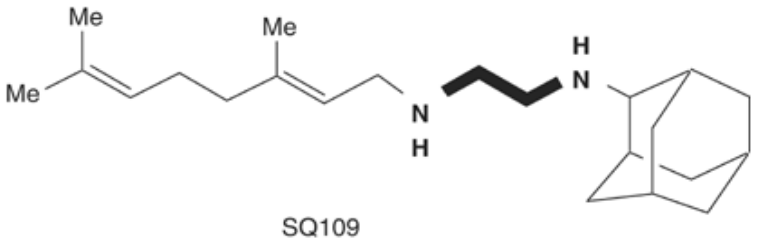
Etambutol - vlastnosti:



EMB

70 - 80 % absorpce po p.o. podání,
biologický poločas 3 - 4 hodiny,
bakteriostatické působení,
sérový peak po 2 - 4 hodinách (p.o.),
používaná dávka je 25 mg/kg první dva měsíce, v pokračovací fázi terapie následuje podávání 15 mg/kg.
Mechanismus účinku: inhibice syntézy buněčné stěny

SQ-109 - vlastnosti:

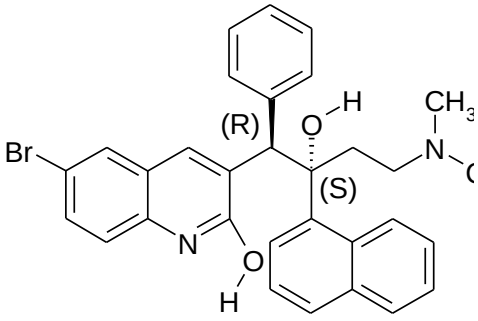


SQ109

vysoká biologická dostupnost po p.o. podání, zakoncentrování v plicích, dlouhý biologický poločas, ekvivalentní aktivita k etambutolu v koncentraci 1:100, baktericidní působení, účinný proti rezistentním mykobakteriím, netoxický v dávce 1000 mg/kg, plně patentovaná ochrana.
Mechanismus účinku: ovlivňuje enzymy, které jsou důležité pro zaplétání dlouhých řetězců mastných kyselin

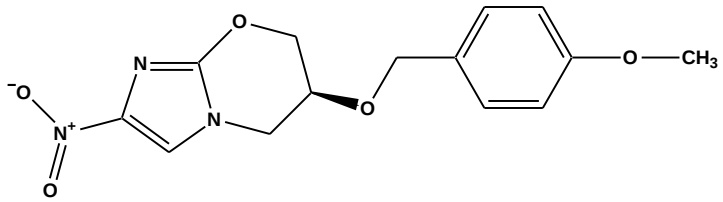
❖ **Diarylchinolony**

Nejvýznamnější látkou je R207910.
Mechanismus účinku: ovlivnění ATP synthasy *M. tuberculosis.*



❖ **Nitroimidazoly (PA-824)**

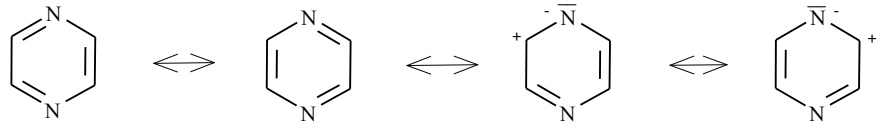
Vlastnosti: silná baktericidní aktivita,
úzké spektrum účinku (TBC specifické),
nadějná účinnost- srovnatelná s isoniazidem na zvířecích modelech,
působí i na latentní formy *M. tuberculosis* (nereplikující).



2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vlastnosti pyrazinového jádra

Pyrazin (1,4-diazin) představuje vysoce symetrickou molekulu. Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid struktur (a - d).



a **b** **c** **d**

Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu. Svými vlastnostmi se blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů.

Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly:[13]

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

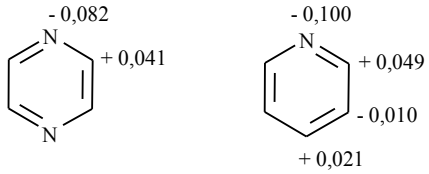
Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná baze, v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je však bazí nejslabší.

Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů:[14]

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

Z hodnot hustoty π-elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota π-elektronů je zvýšená na dusíkových atomech, zatímco na uhlíkových atomech

je hustota výrazně menší. Vypočítané hodnoty se od naměřených hodnot téměř neliší. Je patrné, že hustoty π-elektronů na α-uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi podobné a lze očekávat i podobnou chemickou reaktivitu α-substituovaných pyrazinů a pyridinu.[15]



Meziatomové vzdálenosti u pyrazinu a ostatních diazinů jsou sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivní geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární, vzdálenost *C-N* je 13,48 nm, *C-C* potom 13,83 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového jádra, takže úhel sevřený N^1, α- a β- uhlíkem je o 5° ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu.[5]

IČ spektra pyrazinů a N-oxidů pyrazinu vykazují čtyři roztažené ν-vibrace v oblasti 1600 - 1370 cm^{-1}. Vibrace v rozmezí 1600 - 1575 cm^{-1} má různou (většinou slabou) intenzitu, v oblasti 1520 - 1500 cm^{-1} slabou až střední intenzitu, v oblasti 1500 - 1465 cm^{-1}a 1420 - 1370 cm^{-1} se nacházejí vibrace středně silné intenzity. Valenční vibrace N-oxidů se objevují v oblasti 1350 - 1260 cm^{-1} a mají silnou intenzitu. U monosubstituovaných pyrazinů se vyskytuje ještě silný pás v oblasti 1060 - 1040 cm^{-1} a 1030 - 1010 cm^{-1}. Navíc mají pyrazinové deriváty ještě mimorovinné ν(C-H) vibrace kruhu v oblasti 860 - 800 cm^{-1}. U nesubstituovaného pyrazinu tato vibrace klesá pod 800 cm^{-1}. Substituenty s -M efektem posunují hodnoty vlnočtu vibrací k vyšším mezím, substituenty s +M efektem tyto hodnoty snižují.

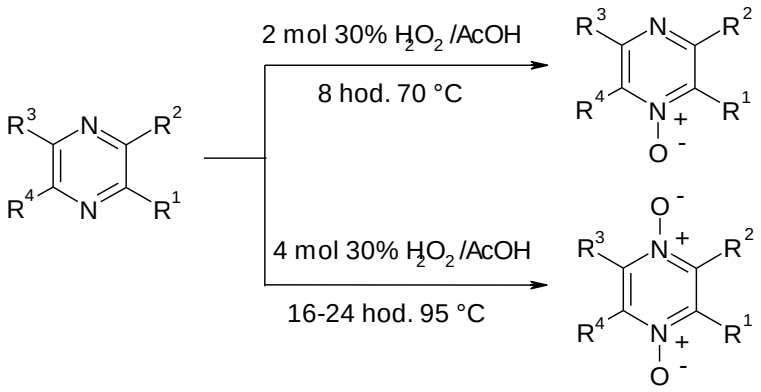
Příklady hodnot vlnočtů a vibrací pyrazinových derivátů: [16]

Sloučenina	**ν pyrazinového kruhu**								**σ(C-H)**
2-aminopyrazin	1590	1535	1488	1430	1175	-	1059	1005	814
2-methylpyrazin	-	-	-	-	-	-	-	-	824
2-chlorpyrazin	1560	1522	1462	1387	1175	1133	1048	1009	839
2-pyrazinkarbonitril	-	-	1464	1401	1176	1148	1147	1013	851
2-pyrazinkarboxamid	1585	1530	1485	1379	1181	1164	1054	1025	869
pyrazin	-	-	1488	1414	1150	1130	1063	1018	784

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 tedy substituce nukleofilní, obzvlášť v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na *N*-oxid. Z preparativního hlediska je významná nukleofilní substituce protonovaných heteroaromatických bazí různými typy radikálů.[5]

2.2. Příprava N- oxidů pyrazinu

N-oxid pyrazinu se připravuje pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci peroxidu vodíku přechází pyrazin na 1-mono- nebo 1,4-dioxid.[17]



2.3. Halogenace pyrazinového jádra

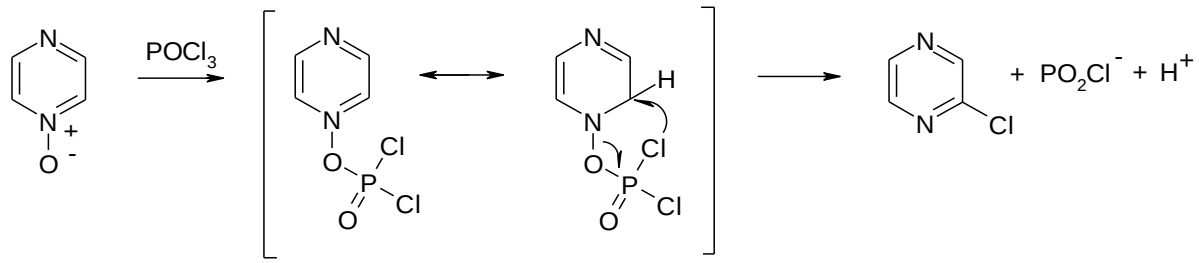
Halogenpyraziny představují důležitou skupinu sloučenin v chemii derivátů pyrazinu, protože umožňují přípravu řady jinak nedostupných derivátů díky snadné záměně atomu halogenu za nukleofil.

Halogenderiváty lze připravit třemi klasickými způsoby:

a) přímou reakcí pyrazinu s halogenem v plynné fázi,

b) záměnou hydroxylu či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu či bromidu fosforylu,

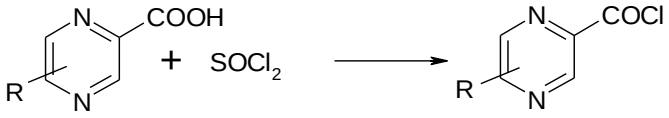
c) nejčastější způsob- nukleofilní halogenace N-oxidu pyrazinu s chloridem fosforylu, která probíhá nejvíce do polohy 2, méně pak do polohy 3 (při 105 °C, zahřívání 2 hodiny).[8]



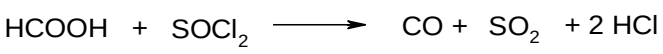
2.4. Příprava acylhalogenidů

Acylhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Ze všech acylhalogenidů mají největší význam acylchloridy.

K přípravě acylhalogenidů se používá reakce kyselin s halogenidy fosforu a síry: chloridem fosforečným, chloridem fosforitým a chloridem thionylu. Někdy je vhodným činidlem pro převádění kyselin na acylchloridy fosgen, popř. chlorid kyseliny šťavelové a pro práci s citlivými kyselinami benzoylchlorid.[18]



V případě, že není možné přebytek thionylchloridu oddestilovat pro blízké teploty varu thionylchloridu a vzniklého acylchloridu, odstraní se přebytečný thionylchlorid přídavkem kyseliny mravenčí podle následující rovnice:

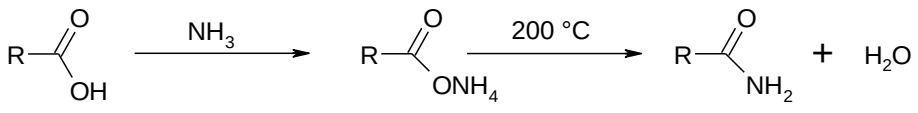


2.5. Příprava anilidů karboxylových kyselin

Zavedení pyrazinamidu do terapie tuberkulózy podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazinkarboxylových kyselin, která tak představuje v chemii derivátů pyrazinu nejlépe prostudovanou skupinu.

Substituované amidy pyrazinkarboxylových kyselin lze připravit:

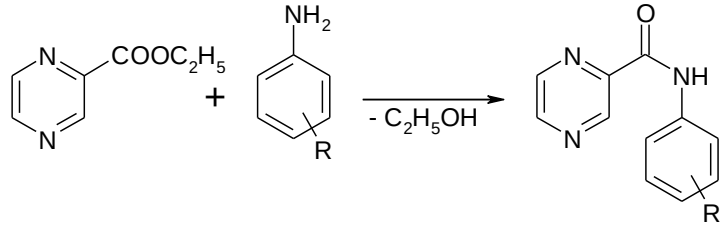
A) reakcí kyseliny - kyselina se převede na sůl s amoniakem, resp. s primárním či sekundárním aminem, následuje tepelný rozklad (za teploty kolem 200 °C). Tímto způsobem lze získat primární, ale i sekundární a terciární amidy:[9]



B) reakcí funkčních derivátů kyseliny (výhodnější cesta přípravy):

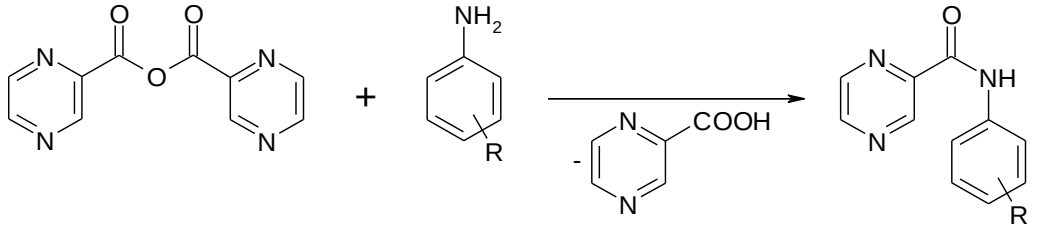
1. Aminolýza esterů pyrazinkarboxylových kyselin

Provádí se za zvýšené teploty zahříváním směsi esteru pyrazinkarboxylové kyseliny s primárním či sekundárním aminem. Často je rovnováha ve prospěch amidu posouvána oddestilováním volného alkoholu.



2. Aminolýza anhydridů kyselin

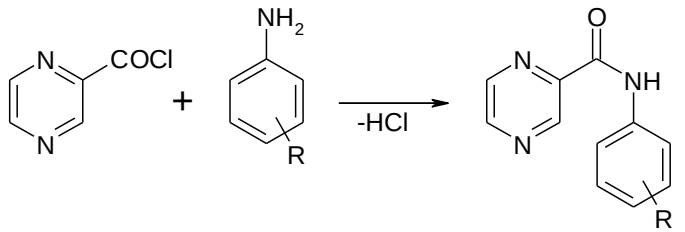
Anhydridy dávají amidy za mírnějších podmínek než volné kyseliny, a to většinou již za studena.



3. Reakce chloridu kyseliny s primárními či sekundárními aminy

(nejpoužívanější metoda)

K vázání uvolněné kyseliny se do reakce přidává pyridin (akceptor protonů) nebo jiný terciární amin, jinak uvolněný chlorovodík vyváže v reakci použitý primární či sekundární amin.[9]



3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a chemikálie

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

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím.

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.

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

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

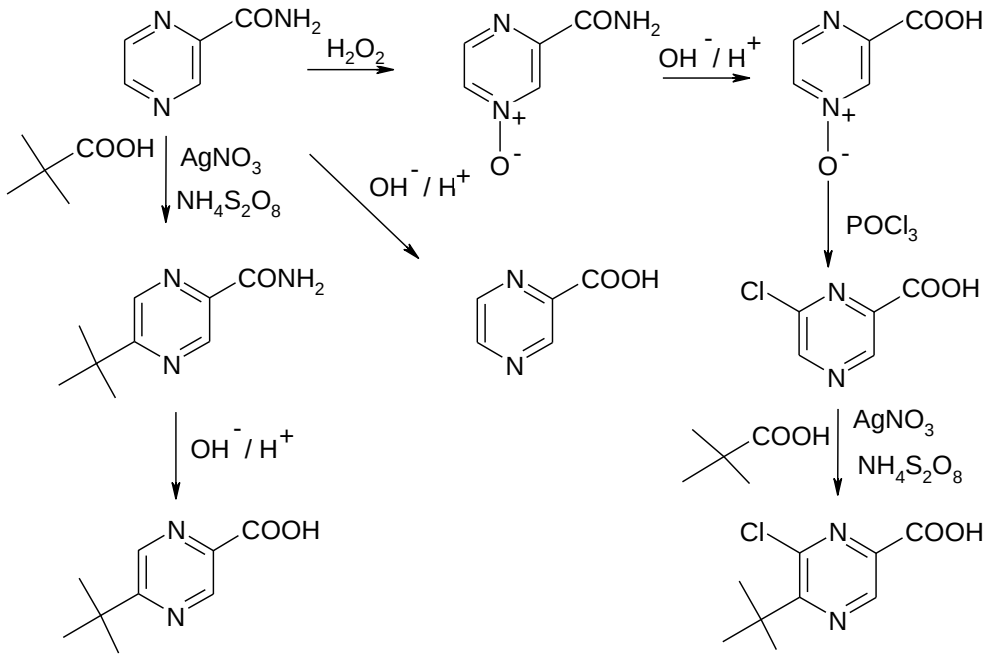
Infračervená spektra byla změřena paní Vencovskou na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg KBr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1}.

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

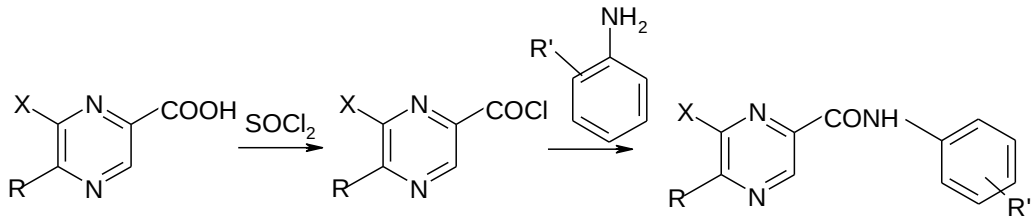
Log *P* sloučenin byl vypočten pomocí programu ACD/log*P* ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto).

3.2. Schéma prováděných reakcí

3.2.1. Příprava výchozích pyrazin-2-karboxylových kyselin



3.2.2. Příprava vlastních anilidů

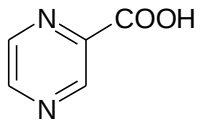


X = H, Cl

R = H, *terc*-butyl

R´= 2-F, 4-SH

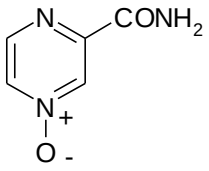
3.3. Příprava pyrazin-2-karboxylové kyseliny



30 g (0,24 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se smíchalo se 112 ml 10% roztoku hydroxidu sodného. Vzniklá směs se vařila se asi dvě hodiny. Roztok se okyselil 15% kyselinou chlorovodíkovou. Vyloučené krystaly pyrazin-2-karboxylové kyseliny se odsály a překrystalizovaly z vody.

Molekulová hmotnost:	124,1
Teplota tání:	223 - 225°C
	(dle literatury[19]: 222 – 225°C za rozkladu)
Výtěžek:	28,7 g (96 % teoretického výtěžku)

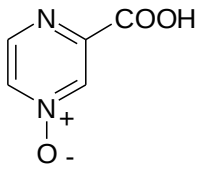
3.4. Příprava 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



K roztoku 170 ml (5,55 mol) 30% peroxidu vodíku ve 260 ml (4,55 mol) ledové kyseliny octové se po částech přidalo 64,0 g (0,52 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Směs se zahřívala na 70 °C a poté se teplota udržovala na 70 - 80 °C po dobu šesti hodin. Po ochlazení se reakční směs ponechala přes noc v lednici. Vyloučené krystaly se odsály, promyly vodou a ethanolem. Krystalizace se prováděla z vody.

Molekulová hmotnost:	139,1
Teplota tání:	303 °C (za rozkladu),
	(dle literatury[20]: 300 °C, 302 - 305 °C za rozkladu)
Výtěžek:	29,55 g (40,3 % teoretického výtěžku)

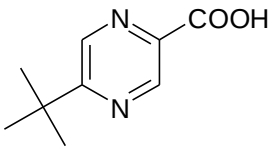
3.5. Příprava 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



29,55 g (0,21 mol) 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se osm hodin zahřívalo k varu s 200 ml (0,50 mol) 10% roztoku hydroxidu sodného. Vyloučené krystaly sodné soli 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se odfiltrovaly a poté rozpustily ve 100 ml horké vody. Roztok se opět zfiltroval a za horka se okyselil 10%kyselinou chlorovodíkovou na pH 3. Vyloučený produkt byl krystalizován z vody.

Molekulová hmotnost:	140,1
Teplota tání:	202 – 203,5 °C
	(dle literatury[21]: 212 – 213 °C)
Výtěžek:	25 g (85 % teoretického výtěžku)

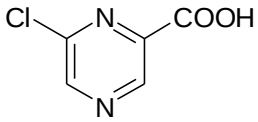
3.6. Příprava 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



36,9 g (0,3 mol) pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustilo v 60 ml vody zahřáté na 80 °C. K roztoku se přidalo 5,1 g (0,03 mol) dusičnanu stříbrného a 30,64 g (0,3 mol) kyseliny pivalové. Směs se intenzivně míchala jednu hodinu v trojhrdlé baňce a postupně se k ní přidával po kapkách roztok 75,24 g (0,33 mol) peroxodisíranu amonného ve 150 ml vody. Teplota reakční směsi se udržovala v rozmezí 75-80 °C. Po ochlazení se směs zalkalizovala 10% roztokem hydroxidu draselného na pH 9. Vzniklá sraženina byla odsáta. Výsledný produkt bílé barvy se následně překrystalizoval z horké vody.

Molekulová hmotnost:	180,1
Teplota tání:	117 °C
	(dle literatury[22]: 118 - 120 °C),
Výtěžek:	44,5 g (82 % teoretického výtěžku)

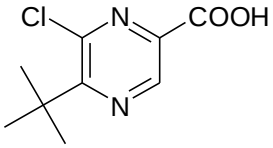
3.7. Příprava 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



14 g (0,1 mol) 4-oxidu 2-pyrazinkarboxylové kyseliny se smíchalo s 45,6 ml (0,5 mol) chloridu fosforylu. Směs se zahřála na teplotu 40 - 50 °C, poté teplota samovolně stoupla na 105 °C. Asi po 15 minutách došlo k ukončení reakce a obsah v baňce byl ochlazen na 10 - 15 °C. Reakční směs byla opatrně po malých částech vylita na led tak, aby teplota při hydrolýze nepřestoupila 50 °C. Nezreagovaný chlorid fosforylu se reakcí s vodou rozložil, což bylo spojeno s uvolňováním tepla. Vzniklý vodný roztok se kontinuálně extrahoval chloroformem, rozpouštědlo bylo následně oddestilováno. Výsledný produkt se překrystalizoval z vody.

Molekulová hmotnost:	158,5
Teplota tání:	153 °C
	(dle literatury[23]: 154 - 155 °C)
Výtěžek:	10,3 g (65 % teoretického výtěžku)

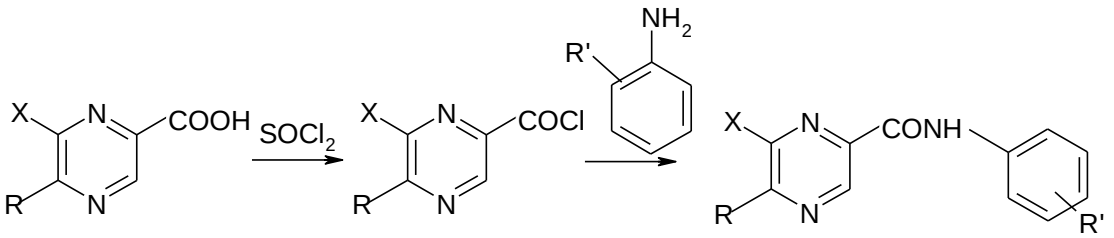
3.8. Příprava 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



6,30 g (0,042 mol) 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny, 0,76 g (0,0042 mol) dusičnanu stříbrného, 4,28 g (0,042 mol) kyseliny pivalové se smíchalo a zahřálo na 80 °C. Tato teplota se udržovala po dobu 60 minut. V průběhu reakce se přiléval roztok 10,58 g (0,0042 mol) peroxodisíranu amonného ve 30 ml destilované vody. Po ochlazení se roztok zfiltroval a filtrát se poté překrystalizoval z vody.

Molekulová hmotnost:	214,6l
Teplota tání:	107 - 110 °C
	(dle literatury[24]: 108 - 110 °C)
Výtěžek:	4,59 g (51 % teoretického výtěžku)

3.9. Obecný postup přípravy anilidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny



X = H, Cl

R = H, *terc*-butyl

R = 2-F, 4-SH

3.9.1. Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny

0,005 mol substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustilo ve 20 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka byla opatřena zpětným chladičem s uzávěrem proti vniknutí vzdušné vlhkosti. K roztoku se přidalo 0,05 mol (5,5 g) thionylchloridu. Vzniklá směs se zahřívala pod zpětným chladičem k varu při teplotě 110°C 1,5 hodiny (byla použita parafinová lázeň vyhřátá na 125 °C). Poté se nezreagovaný thionylchlorid oddestiloval za sníženého tlaku. Na závěr se přidalo malé množství toluenu pro azeotropní oddestilování zbytku chloridu thionylu z produktu. Surový produkt v baňce se dále nečistil a byl použit do další reakce.

3.9.2. Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

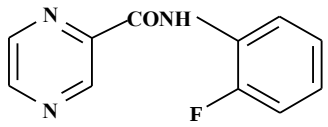
0,0017 mol substituovaného anilinu se rozpustilo v 10 ml bezvodého acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku bylo přidáno 0,0017 mol (0,14 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce se po kapkách přidával roztok 0,0017 mol chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém acetonu.. Směs se míchala asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté se aceton oddestiloval za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl překrystalizován ze směsi voda:ethanol.

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

Pozn. Při použití aminothiofenolu byl postup přípravy anilidu pyrazinkarboxylové kyseliny modifikován. Reakce chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny s aminothiofenolem probíhala pod atmosférou argonu. Důvodem je nestabilita aminothiofenolu v přítomnosti vzdušného kyslíku.

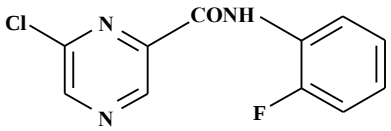
3.10. Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky

1. 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



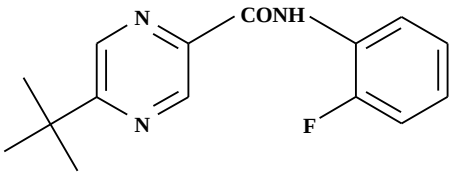
Výtěžek	0,18 g (51 %)
M.h.	217,2
Sumární vzorec	$C_{11}H_8FN_3O$
T_t	109-109,5°C
R_F	0,82
Elementární analýza	vypoč.: C 60,83 %, H 3,71 %, F 8,75 %, N 19,35 %, O 7,37 % naměř.: C 60,66 %, H 3,99 %, N 19,3 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3262 (N-H), 1676 (C=O), 1536 (C arom.), 1318, 1256, 1099, 1020 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.98 (1H, bs, NH), 9.51 (1H, d, *J*=1.5 Hz, H3), 8.67 (1H, d, *J*=2.5 Hz, H6), 8.62 (1H, dd, *J*=2.5 Hz, *J*=1.5 Hz, H5), 8.55 (1H, td, *J*=8.2 Hz, *J*=1.9 Hz, H4´), 7.24-7.07 (3H, m, H3´, H5´, H6´)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 160.7, 152.8 (d, *J*=244.6 Hz), 147.7, 144.6, 144.2, 142.5, 125.8 (d, J=10.3 Hz), 124.8 (d overlapped, *J*=21.2 Hz), 124.8 (d overlapped, *J*=9.7 Hz), 121.3, 115.0 (d, *J*=18.9 Hz)

2. 2-fluoranilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



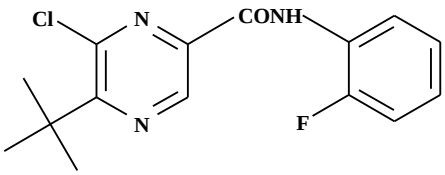
Výtěžek	0,07 g (22 %)
M.h.	251,7
Sumární vzorec	$C_{11}H_7ClFN_3O$
T_t	77,5-78,5
R_F	0,92
Elementární analýza	vypoč.: C 52,50 %, H 2,80 %, Cl 14,09 %, F 7,55 %, N 16,70 %, O 6,36 % naměř.: C 51,42 %, H 2,99 %, N 17,3 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3368 (N-H), 1708 (C=O), 1538 (C arom.), 1388, 1325, 1192, 1120 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.65 (1H, bs, NH), 9.38 (1H, s, *J*=1.4 Hz, H3), 8.82 (1H, s, *J*=1.4 Hz, H5), 8.50 (1H, t, *J*=1.4 Hz, H6´), 7.25 (1H, m, H3´), 7.18 (1H, m, H5´), 7.10 (1H, m, H4´).
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ159.5, 154.5, 151.3, 147.7 (d, *J*=7.5 Hz), 143.7, 142.1, 125.5, 125.3 (d, *J*=3.5 Hz), 124.7 (d, *J*=3.5 Hz), 121.6, 115.1 (d, *J*=18.9 Hz).

3. 2-fluoranilid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



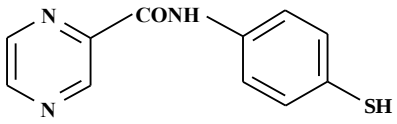
Výtěžek	0,14 g (46 %)
M.h.	273,3
Sumární vzorec	$C_{15}H_{16}FN_3O$
T_t	98,2-99,7°C
R_F	0,91
Elementární analýza	vypoč.: C 65,92 %, H 5,90 %, F 6,95 %, N 15,37 %, O 5,85 % naměř.: C 66,165 %, H 6,54 %, N 13,905 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3355 (N-H), 2969 (C alif.), 1693 (C=O), 1538 (C arom.), 1322, 1254, 1143, 1031 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.97 (1H, bs, NH), 9.39 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.67 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6), 8.56 (1H, td, *J*=8.2 Hz, *J*=1.7 Hz, H4´), 7.24-7.05 (3H, m, H3´, H5´, H6´), 1.49 (9H, s, CH3)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 167.9, 161.2, 152.8 (d, *J*=244.3 Hz), 142.9, 141.2, 139.3, 126.1 (d, *J*=10.0 Hz), 124.7 (d, *J*=3.5 Hz), 124.6, 121.3, 115.0 (d, *J*=18.9 Hz), 37.1, 29.7

4. 2-fluoranilid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



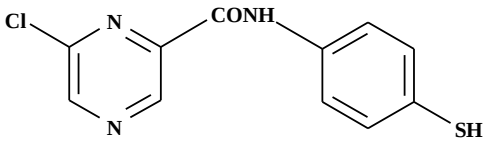
Výtěžek	0,060 g (21 %)
M.h.	294,7
Sumární vzorec	$C_{14}H_{14}ClFN_3O$
T_t	81,7°C
R_F	0,95
Elementární analýza	vypoč.: C 57,05 %, H 4,79 %, Cl 12,03 %, F 6,45 %, N 14,26%, O 5,43 % naměř.: C 56,17 %, H 5,54 %, N 13,91 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3385 (N-H), 2978 (C alif.), 1699 (C=O), 1532 (C arom.), 1259, 1149, 1057 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.64 (1H, bs, NH), 9.23 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H3), 8.50 (1H, d, *J*=1.4 Hz, H6´), 7.22 (1H, m, H3´), 7.20 (1H, m, H5´), 7.08 (1H, m, H4´),1.55 (9H, s, CH_3).
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 164.8, 159.9, 154.5, 151.2, 145.9, 140.8, 125.7 (d, *J*=10.0 Hz), 125.1 (d, *J*=3.5 Hz), 124.6 (d, *J*=3.5 Hz), 121.5, 115.1 (d, *J*=18.9 Hz)

5. (4-merkaptofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



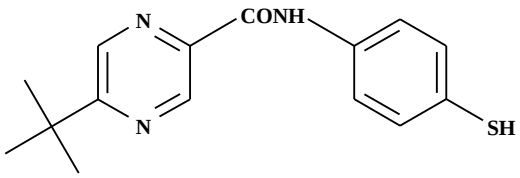
Výtěžek	0,060 g (16 %)
M.h.	231,3
Sumární vzorec	$C_{11}H_9N_3OS$
T_t	115-117°C
R_F	0,76
Elementární analýza	vypoč.: C 57,13 %, H 3,92 %, N 18,17 %, O 6,92 %, S 13,86 % naměř.: C 60,235 %, H 5,315 %, N 12,955 %, S 12,76 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3346 (N-H), 1681 (C=O), 1523 (C arom.), 1395, 1312, 1125, 1021 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.75 (1H, bs, NH), 9.52 (1H, s, H3), 8.83 (1H, d, *J*=2.2 Hz, H6), 8.62-8.57 (1H, m, H5), 7.81-7.72 (2H, m, AA´, BB´, H2´, H6´), 7.60-7.52 (2H, m, AA´, BB´, H3´, H5´)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 160.7, 147.7, 144.7, 144.1, 142.4, 138.6, 138.1, 127.2, 119.8

6. (4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



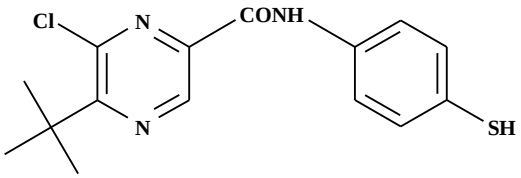
Výtěžek	0,086 g (26 %),
M.h.	265,7
Sumární vzorec	$C_{11}H_8ClN_3OS$
T_t	123-124°C
R_F	0,91
Elementární analýza	vypoč.: C 49,72 %, H 3,03 %, Cl 13,34 %, N 15,81 %, O 6,02 %, S 12,07 % naměř.: C 53,915 %, H 3,915 %, N 13,46 %, S 12,74 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3368 (N-H), 1690 (C=O), 1519 (C arom.), 1402, 1313, 1168, 1012 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.41 (1H, bs, NH), 9.38 (1H, s, H3), 8.81 (1H, s, H5), 7.77-7.67 (2H, m, AA´, BB´, H2´, H6´), 7.58-7.48 (2H, m, AA´, BB´, H3´, H5´)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 159.4, 147.7, 147.4, 143.7, 142.2, 136.5, 133.2, 129.8, 120.6

7. (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Výtěžek	0,05 g (16 %)
M.h.	287,4
Sumární vzorec	$C_{15}H_{17}N_3OS$
T_t	124°C
R_F	0,93
Elementární analýza	vypoč.: C 62,69 %, H 5,96 %, N 14,62 %, O 5,57 %, S 11,16 % naměř.: C 63,345 %, H 6,435 %, N 11,64 %, S 12,425 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3370 (N-H), 2962 (C alif.), 1690 (C=O), 1520 (C arom.), 1399, 1313, 1239, 1142 (pyrazin)
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	směs látek
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	směs látek

8. (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Výtěžek	0,05 g (17 %)
M.h.	321,8
Sumární vzorec	$C_{15}H_{16}ClN_3OS$
T_t	80-81°C
R_F	0,92
Elementární analýza	vypoč.: C 55,98 %, H 5,01 %, Cl 11,02 %, N 13,06 %, O 4,97 %, S 9,96 % naměř.: C 56,35 %, H 4,31 %, N 12,55 %, S 1076 %
IČ spektrum (KBr), cm^{-1}	3368 (N-H), 2969 (C alif.), 1691 (C=O), 1518 (C arom.), 1399, 1307, 1148, 1060 (pyrazin)
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.64 (1H, t, NH), 9.07 (1H, t, H3), 8.01 (1H, d, H2´), 7.88 (1H, d, H6´), 7.58 (1H, d, H5´), 7.24 (1H, d, H3´), 3.35 (1H, s, SH), 1.55 (9H, s, CH_3)
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	nebylo změřeno z důvodu malého množství látky

4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

4.1. Antituberkulotická aktivita

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis* $H_{37}Rv$ v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility). Antimykobakteriální aktivita se testuje na *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ v BACTEC 12B mediu použitím BACTEC 460 radiometrického systému.[25]

Testovaná látka č.	% inhibice při 6,25 μg/ml
1	**46**
2	20
3	23
4	14
5	7
6	3
7	**44**
8	8

4.2. Antifungální aktivita

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

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antifungální aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640 s glutaminem, roztok byl pufrován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS. Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975 μM. 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, ve vlhké atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

Pozn. RPMI 1640 = medium (zkratka z angl. Rockwell Park Memorial Institute)

MOPS - systematicky: 3-(morfolino)propansulfonová kyselina.

Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti kmenu (kód, číslo):

Candida albicans ATCC 44859 (CA1)
C. tropicalis 156 (CT)
C. krussei E28 (CK2)
C. glabrata 20/I (CG)
Trichosporon beigelii 1188 (TB)
Trichophyton mentagrophytes 445 (TM)
Aspergillus fumigatus 231(AF)
Absidia corymbifera 272 (AC)[26]

Testovaná látka MIC/IC_{80} (µmol/l)	***Candida albicans* ATCC 44859**		***Trichophyton mentagrophytes* 445**	
	24 h	**48 h**	**72 h**	**120 h**
1	>500	>500	>500	>500
2	>500	>500	>500	>500
3	**62,5**	>500	**62,5**	**62,5**
4	**62,5**	>500	**62,5**	>500
5	-	-	-	-
6	125	>500	>500	>500
7	>125	>125	**62,5**	>125
8	125	>500	500	500

Pozn. MIC/IC_{80} derivátů pyrazinu u ostatních testovaných houbových kmenů byly příliš vysoké (většina >500 µmol/l), proto je neuvádím.

U látky č. 5 nebyly testy provedeny z důvodu nízké rozpustnosti v použitém rozpouštědle.

Tabulka hodnot MIC/IC_{80} v terapii běžně používaného flukonazolu

(DIFLUCAN, MYCOMAX)

Testované kmeny	**MIC/ IC_{80} (µmol/l)**							
	CA	**CT**	**CK**	**CG**	**TB**	**TM**	**AF**	**AC**
Délka inkubace	**24 h**	**24 h**	**24 h**	**24 h**	**24 h**	**72 h**	**24 h**	**24 h**
	48 h	**48 h**	**48 h**	**48 h**	**48 h**	**120 h**	**48 h**	**48 h**
flukonazol	0,06	0,12	3,91	0,98	0,24	1,95	>125	>125
	0,12	>125	15,62	3,91	0,48	3,91	>125	>125

4.3. Herbicidní aktivita

Připravené deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny byly podrobeny testování *in vitro* na herbicidní aktivitu (tj. měření inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu a testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*. Testování bylo provedeno Chemickým ústavem Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě (dr. Katarína Kráľová, Csc.).

4.3.1. Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu

Chloroplasty byly připraveny metodou dle Walkera[27] z rostliny špenátu (*Spinacia oleracea*). Inhibice přenosu elektronů při fotosyntéze v chloroplastech špenátu byla stanovena spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) za použití 2,6-dichlorfenol-indofenolu (DCIPP) jako akceptoru elektronů metodikou Kráľové[28]. Testované látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO v použité koncentraci (nejvýše 4 %) neovlivňuje fotochemické pochody v chloroplastech špenátu. Účinnost inhibice testovaných látek je vyjádřena jako IC_{50}, což odpovídá molární koncentraci látky způsobující 50% pokles produkce kyslíku oproti kontrolní skupině. Jako standard byl použit selektivní herbicid DCMU.

Pozn. DCMU- systematicky: 3-(3, 4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea.

4.3.2. Testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*

Zelená řasa *Chlorella vulgaris* byla kultivována při pokojové teplotě metodou dle Kráľové[29]. Účinek sloučenin na obsah chlorofylu v řasách byl zjišťován po 4-denní kultivaci řas v přítomnosti sledované látky, výsledek byl stanoven spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) po extrakci chlorofylu methanolem podle Wellburna[30]. Látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v DMSO, kontrolní vzorky obsahovaly stejné množství DMSO jako testované. Antialgální aktivita je vyjádřena jako IC_{50}, jako standard byl použit DCMU.

Herbicidní aktivita připravených látek ve srovnání s účinností standardu DCMU

Testovaná látka	Inhibice fotosyntézy (*Spinacia oleracea*)	Redukce obsahu chlorofylu (*Chlorella vulgaris*)
	IC_{50} (mmol/l)	IC_{50} (mmol/l)
1	1,012	0,161
2	0,946	0,082
3	0,676	0,235
4	**0,069**	0,086
5	0,430	0,098
6	0,385	**0,065**
7	0,319	0,180
8	-	0,690
DCMU	0,0019	0,0073

Pozn. Látka č. 8 se nerozpouštěla v DMSO v dostatečné míře.

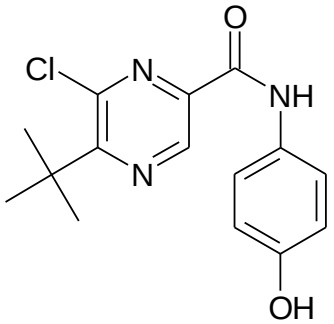
5. DISKUSE

Ve své rigorózní práci jsem se zaměřila na syntézu látek ze skupiny anilidů substituované pyrazinkarboxylové kyseliny. Na katedře bylo v minulosti připraveno několik sérií látek tohoto typu[17,31,32,33,34], u kterých se na aromatickém jádře vyskytovaly v různých polohách fenolická (kyselá) skupina, popř. lipofilní skupiny (alkyly, alkoxyskupiny, halogeny).

Cílem této rigorózní práce bylo připravit sloučeniny, které obsahují navázaný fluor na aromatickém jádře v poloze *ortho* a zjištění vlivu této substituce na biologický účinek.

S velkým očekáváním byly také připraveny sloučeniny substituované thiolovou skupinou na aromatickém jádře v poloze *para*. Látka číslo 8 ((4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny) představuje sirný analog prozatím nejúčinnější látky typu anilidu pyrazinkarboxylové kyseliny ((4- hydroxyanilid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny -obrázek 3).[31]

Obr. 3. anilid kyseliny pyrazinkarboxylové



Zavedení thiolové skupiny na aromatické jádro mělo vést ke zvýšení lipofility a byl očekáván i vyšší biologický účinek.

Celkem jsem připravila osm látek, které mohu rozdělit na 2 série. První sérii tvoří čtyři sloučeniny, které obsahují navázaný flour v poloze *ortho* na aromatickém jádře a liší se substituenty na pyrazinovém jádře. Druhá série čtyř látek má společnou thiolovou skupinu v poloze *para* na aromatickém jádře a opět se liší substituenty na pyrazinu.

Látky byly připraveny reakcí chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny s příslušnými aminy. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

1. příprava chloridu substituované pyrazinkarboxylové kyseliny v bezvodém toluenu,
2. vlastní syntéza anilidu příslušné kyseliny aminolýzou.

Reakce probíhaly většinou hladce a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 16 - 51% v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu popř. v závislosti na stabilitě aminothiofenolu. Čištění látek jsem prováděla rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

Finální látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, ^{1}H a ^{13}C NMR spektry (kromě látky č. 8), popř. elementární analýzou.

Dále byla u látek zjištěna lipofilita pomocí log *P* a log *K*. Předpokládá se, že dostatečná lipofilita je jedním ze základních podmínek důležitých pro průnik přes vysoce lipofilní mykobakteriální stěnu.

Log *P* sloučenin jsem získala pomocí programu ACD/log*P* ver.1.0. (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí 1,1 až 4,15. Dále byla určena hodnota kapacitního faktoru *K* za použití HPLC (Waters Alliance 2695 XE and Waters Photodiode Array Detector 2996). Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu p.a. (70 %) a vody (30 %). Detekce probíhala spektrofotometricky při 223 nm. Byl změřen retenční čas T_R (vzdálenost od nástřiku k maximu píku) a mrtvý retenční čas T_D (vzdálenost od nástřiku k maximu píku nesorbované látky: použit roztok KI v methanolu). Kapacitní faktor byl spočítán použitím programu Millennium 32^R podle vzorce:

$$K = T_R - T_D / T_D$$

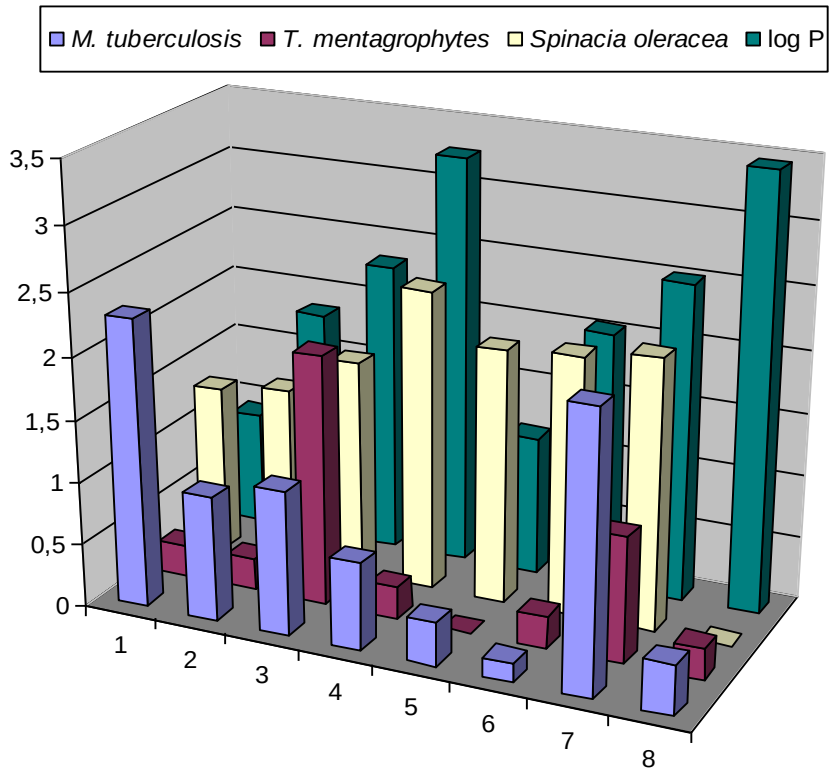
Log *K* je pak spočítán z kapacitního faktoru *K* a je použit jako index lipofility.

Tabulka 3. Vypočítané lipofility (log *P*), chromatograficky stanoveného log *K* a čistoty látek

Látka č.	**log *P***	**log *K***	**Čistota (%)**
1	1,10 ± 0,46	0,4598	99,86
2	2,22 ± 0,48	0,7651	99,54
3	2,79 ± 0.47	1,0885	99,82
4	3,91 ± 0,49	1,4465	97,21
5	1,34 ± 0,45	0,4705	73,91
6	2,46 ± 0,48	0,7725	32,11
7	3,03 ± 0,47	1,0412	87,59
8	4,15 ± 0,49	1,3414	53,35

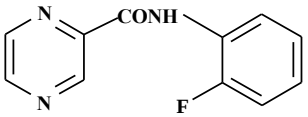
Z tabulky 3 je patrné, že obsah látek č. 6 a 8 je relativně velmi nízký. Důvodem byla zřejmě nestabilita výchozího aminothiofenolu.

Graf log *P* jednotlivých sloučenin a významnějších výsledků biologického hodnocení:

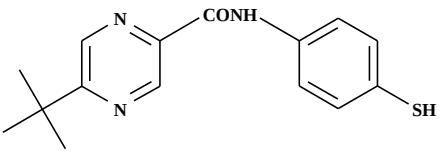


Z grafu je patrné, že lipofilita stoupá s molekulovou hmotností, ve skupině látek odvozených od stejné kyseliny jsou viditelně lipofilnější sloučeniny s thiolovou skupinou než látky substituované fluorem.

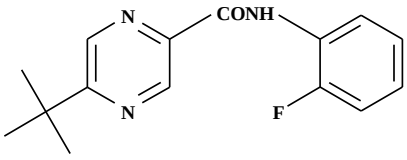
Níže jsou uvedeny struktury nejaktivnějších sloučenin: nejvyšší antimykobakteriální efekt byl zjištěn u látky č. **1** a **7**, nejvyšší antifungální účinek byl změřen u látky č. **3**, nejvyšší schopnost inhibovat vývoj kyslíku v listech špenátu měla látky č. **4.**



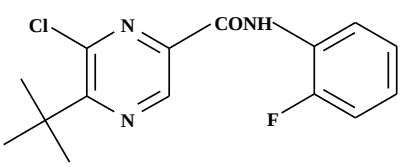
1



7



3



4

Všechny látky byly podrobeny testování na **antituberkulotickou aktivitu** v TAACF. Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu *in vitro* vykazovaly sloučeniny č. **1** a **7** (2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny, (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny). Přesto zjištěné procento inhibice není příliš významné (46 % a 44 %). Obě látky jsou substitucí jak pyrazinového, tak i benzenového jádra odlišné. Stejně tak se liší i ve své lipofilitě. Z těchto údajů lze obtížně určit vztah mezi strukturou a biologickým účinkem, resp. určit, zda větší roli v účinnosti látek hraje velikost nebo lipofilita molekuly. Např. pyrazinamid (běžně používán v terapii TBC), je účinný pravděpodobně proto, že díky své malé molekule snadno pronikne přes mykobakteriální stěnu, přestože je velmi málo lipofilní.

Velké naděje byly vkládány do látky č. 8 ((4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny), která představuje sirný analog 4-hydroxyanilid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny (viz. výše), která vykazovala relativně významnou antimykobakteriální aktivitu (97% inhibice při koncentraci 6,25 μmol/l, log *P* = 3,20). Podle výsledků však zvýšením lipofility (teoretický předpoklad pro snadnější průnik přes vysoce lipofilní membránu *M. tuberculosis*), nedošlo ke zvýšení účinku (antimikobakteriální aktivita pouze 8 %).

Pozn. Látka č. 8 (a č. 6) byla před odesláním na biologické hodnocení přečištěna.

Kromě látky číslo 5, jsem získala výsledky testování **antifungální aktivity**. Nejvyšší antifungální aktivitu *in vitro* vykazovala sloučenina č. **3** (2-fluoranilid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny) a to zejména proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes,* dále částečně proti kmenu *Candida albicans.* Relativně účinné proti *Trichophyton mentagrophytes* jsou i látky číslo 4 a 7 (pouze po dobu inkubace 72 h). Lze tedy zaznamenat pozitivní vliv substituce pyrazinového jádra *terc*-butylem, tyto látky jsou středně lipofilní. Po srovnání s flukonazolem jde však o aktivitu velmi slabou.

Při testování herbicidní aktivity nově připravených látek v testu **inhibice vývoje kyslíku** byla nejúčinější látka č. **4** (2-fluoranilid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny)**,** po srovnání se standardem DCMU je však aktivita stále nízká.

V testu **redukce obsahu chlorofylu v zelené řase** má nejvyšší aktivitu látka č. **6** ((4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny), účinnost této látky je však stále ještě 10-krát nižší než u použitého standardu DCMU. (Pro přehlednost grafu nejsou tyto aktivity v grafu uvedeny).

6. ZÁVĚR

V rámci této rigorózní práce jsem plnila následující úkoly:

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

2. V dostupné chemické literatuře jsem zjistila metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.

3. Připravila jsem tyto v literatuře dosud nepopsané produkty:
   1.) 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   2.) 2-fluoranilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
   3.) 2-fluoranilid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
   4.) 2-fluoranilid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
   5.) (4-merkaptofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
   6.) (4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
   7.) (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
   8.) (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc*-butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny

Výše uvedené produkty jsou charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ, ^{1}H, popř. ^{13}C NMR spektry.

4. Sérii látek jsem podrobila *in vitro* biologickému hodnocení.

Získala jsem údaje o antimykobakteriální, antifungální aktivitě a výsledky testů herbicidní aktivity (testy inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu a testy redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*). Tyto výsledky jsem graficky zpracovala.

5. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log *P* nově připravených látek:
Log *P* připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 1,1 a 4,15.

6. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (viz. Diskuse).

7. PŘÍLOHA

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

8. SEZNAM LITERATURY

1. RÖSLEROVÁ, Z. Syntéza substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny jako potenciálních léčiv. *Studentská vědecká konference*. Hradec Králové. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta, 28. dubna 2005.

2. RÖSLEROVÁ, Z. Diplomová práce. *Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.* Hradec Králové. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, 5. června 2006, s. 54

3. DOLEŽAL, M. - PALEK, L. - RÖSLEROVÁ, Z. - KUNEŠ, J. - BUCHTA, V. - KRÁĽOVÁ, K. Substituted Pyrazinecarboxamides: Preparation and Biological Aktivity. Proceedings of ECSOC-8. *The Eight International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*. Dostupné z: <http://www.mdpi.org/ecsoc-8.htm> November 1-30, 2004, Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, ISBN 3-906980-15-4, Published in 2004 by MDPI, Basel, Switzerland, (c) 2004 by MDPI, Basel, Switzerland.

4. SOLOVIČ, I. *Via practica* , 2004, vol. 4, p. 215-219.

5. TRIPATHI, R.P. - TEWARI, N. - DWIVEDI, N. - TIWARI, V.K. *Medicinal Research Reviews,* 2005, vol. 25, no.1, p. 93 - 131.

6. BUCHTA V. - ÍLEK P. - HORÁČEK J. - HORÁK V. Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha: Karolinum, 1998, s. 33.

7. Dostupné z: ⟨http:// www.raw-milk-facts.com⟩

8. *WHO varuje před tuberkulózou odolnou vůči lékům* [on line]. c 2006 [cit. 2006-09-06]. Dostupné z: ⟨http:// www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/6749_19001.html⟩

9. LINCOVÁ, D. - FARGHALI, H., et al. Základní a aplikovaná farmakologie. In *Antituberkulotika.* Praha: Galén, Karolinum 2002, s.461 -463. ISBN: 8072621688.

10. HARTL,J. - DOLEŽAL,M. - MILETÍN,M. - OPLETALOVÁ,V. - ZIMČÍK,P. Farmaceutická chemie IV.,Praha:Karolinum, 2006, s.123

11. ZHANG, Y. - WADE, M.M. - SCORPIO, A., et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 2003, vol. 52, no.5, p. 790-795.

12. VERON, A. Clinical and Health Systems Branch. *Division of TB Elimination,* March 2005.

13. POŽARSKIJ, A F. *Chim. Geterocikl. Soedin.,* 1987, vol.7, p.867.

14. PRATT, Y. T. The Pyrazines and Piperazines. In: Elderfield, R. C. *Heterocyclic Compounds*, 1957, vol. 6.

15. BLACK, P. J. - MCDOWEL, C. A. *Mol. Phys*., 1967, vol. 12, , p. 233. *Chem. Abstr.,* 1967, vol. 67, 77716d.

16. SHINDO, H. *Chem Pharm. Bull.,* 1960, vol. 8, p.33.

17. KLEIN, B. - HETMAN, N. E. - O'DONNELL, M. E. *J. Org. Chem*., 1963, vol. 28, p.1682

18. ČERVINKA, O. a kol. Chemie organických sloučenin, 1. vyd., 2. díl, SNTL, Praha, 1987, s. 49-50, s.73-76.

19. FOKS, H. - JANOWIEC, M. - ZIELENIECKI, M. *Acta Polon. Pharm*., 1964, vol.21, p.429.

20. BERNARDI, L. et al. *Gaz. Chim. Ital*., 1961, vol. 91, p. 1434. *Chem. Abstr*. 1962, vol. 57, p. 2223.

21. FOKS, H. - JANOWIEC, M. - ZIELENIECKI, M. *Pol. J. Pharm*., 1977, vol. 29, p. 663.

22. AMBROGI, V. et al. *Eur. J. Med*., 1980, vol. 15, p.157.

23. ABE, Y. - SHIGETA, Y. - UCHIMARU, F et al. Japan Pat. 69, 1969, vol. 12, p.898; *Ref. Chem. Abstr.*, 1969, vol. 71, 112979y.

24. DOLEŽAL, M. - HARTL, J. - MILETÍN, M. - MACHÁČEK, M. - KRÁĽOVÁ, K. *Chem Pap.*, 1999, vol. 53, p. 126.

25. KRÁĽOVÁ, K. - ŠERŠEŇ, F. - SIDOOVÁ, E. *Chem. Pap*., 1992, vol. 46, p. 348.

26. DOLEŽAL, M. - VIČÍK, R. - MILETÍN, M. - KRÁĽOVÁ, K. *Chem Pap*., 2000, vol. 54, p. 245.

27. WALKER, D.A. *In Methods in Enzymology Part C*; S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Ed.; Academic Press: New York, 1980, vol. 69, p. 94-104.

28. KRÁĽOVÁ, K. - ŠERŠEŇ, F. - SIDOOVÁ, E. *Chem. Pap*., 1992, vol. 46, p. 348.

29. KRÁĽOVÁ, K. - ŠERŠEŇ, F. - MELNIK, M. J. *Trace Microprobe Techn*., 1998, vol. 16, p. 491.

30. WELLBURN, A..R. *J. Plant. Physiol*., 1994, vol. 144, p.307.

31. DOLEŽAL, M. - HARTL, J. - MILETIN, M., et al. *Chem. Pap*., 1999, vol. 53, p. 126.

32. DOLEŽAL,M. - MILETÍN, M. - HARTL, J, et al. *4th Int. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4)*, September 2000, p 1-30, Dostupné z: ⟨http://www.unibas.ch/mdpi/ecsoc-4/c0028/c0028.htm⟩.

33. DOLEŽAL, M. - KRÁĽOVÁ, K. - ŠERŠEŇ, F. - MILETÍN, M. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 2001, vol. 26, p. 13. Dostupné z: ⟨http://www.faf.cuni.cz/folia/26/2602dolezal. htm⟩.

34. DOLEŽAL, M. - HARTL, J. - MILETÍN, M., et al. *Folia Pharm. Univ. Carol*., 2000, vol. 25, p.15. Dostupné z: ⟨http://www.faf.cuni.cz/folia/25/2502dolezal.htm⟩.