

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

SUBSTITUOVANÉ AMIDY
PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY
JAKO POTENCIÁLNÍ LÉČIVA I.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2006

Mgr. RUDOLF BRUNER

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

OBSAH

1	ÚVOD	4
1.1	ZÁKLADNÍ ASPEKTY TUBERKULÓZY	4
1.1.1	Výskyt tuberkulózy	4
1.1.2	Původce tuberkulózy	7
1.1.3	Přenos infekce tuberkulózy	9
1.1.4	Diagnostika tuberkulózy	10
1.1.5	Patogeneze a symptomy tuberkulózy	11
1.1.6	Terapie tuberkulózy v současnosti	12
1.1.7	Prevence tuberkulózy	13
1.2	ANTITUBERKULOTIKA	14
1.2.1	Antituberkulotika první volby	14
1.2.2	Další antituberkulotika	19
1.2.3	Potenciální antituberkulotika	23
2	CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE	26
3	TEORETICKÁ ČÁST	27
3.1	PYRAZINOVÉ JÁDRO	27
3.2	PŘÍPRAVA N-OXIDŮ PYRAZINU	29
3.3	HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA	29
3.4	PŘÍPRAVA ACYLHALOGENIDŮ	30
3.5	PŘÍPRAVA ANILIDŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN	31
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	34
4.2	SCHEMA PROVÁDĚNÝCH REAKCÍ	35
4.2.1	Syntéza výchozích substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin	35
4.2.2	Syntéza chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin	36
4.2.3	Syntéza anilidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin	36
4.3	OBECNÝ POSTUP PŘÍPRAVY	37
4.3.1	Příprava chloridů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin	37
4.3.2	Příprava anilidů substituovaných pyrazin-2-karboxylových kyselin	37
4.4	PRINCIPY BIOLOGICKÉHO HODNOCENÍ	38
4.4.1	Antituberkulotická aktivita	38
4.4.2	Antimykotická aktivita	39
4.4.3	Herbicidní aktivita	40
5	VÝSLEDKY RIGORÓZNÍ PRÁCE	41
5.1	NOVĚ PŘIPRAVENÉ LÁTKY A JEJICH ANALYTICKÁ DATA	41
5.2	LIPOFILITA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK	49
5.3	VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTITUBERKULOTICKÉ AKTIVITY	51
5.4	VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTIMYKOTICKÉ AKTIVITY	51
5.5	VÝSLEDKY HODNOCENÍ HERBICIDNÍ AKTIVITY	52
6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR	55
8	LITERATURA	56

1 ÚVOD

1.1 ZÁKLADNÍ ASPEKTY TUBERKULÓZY

1.1.1 VÝSKYT TUBERKULÓZY

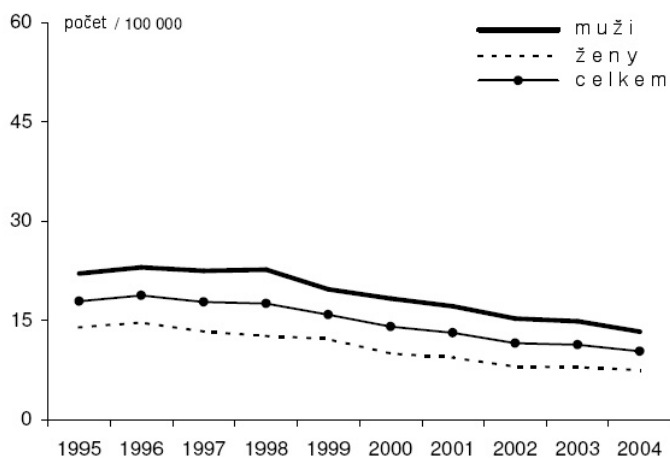
Tuberkulóza (TBC) nás neopustila ani ve 21. století. Toto onemocnění, doprovázející člověka již od počátků lidské civilizace, patří v globálním měřítku mezi nejzávažnější infekční onemocnění v současnosti. Celosvětově je podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) infikována tuberkulózou jedna třetina populace. Z tohoto počtu se tuberkulóza rozvine v manifestní formu u 10 % infikovaných jedinců. U jedné poloviny z nich se tak stane v průběhu prvních pěti let a u druhé poloviny do konce jejich života. Znepokojivé jsou i další fakta uváděná WHO, a to rostoucí výskyt tuberkulózy každým rokem o 1 % a každoročně se zvyšující počet případů rezistentních kmenů o 450 000. Polovina všech nových případů připadá na šest asijských zemí (Bangladéš, Čína, Indie, Indonésie, Pákistán a Filipíny). Výzkumy rovněž prokazují, že každý den zemře na tuberkulózu 5000 lidí.^{1,2}

Tuberkulóza je považovaná především za „sociální chorobu“, jelikož postihuje především jedince z chudých vrstev, s nedostatečnou výživou a špatnou úrovní hygieny. Z toho vyplývá, že je jedním z dominantních zdravotnických problémů hlavně v rozvojových zemích. V těchto zemích se tak vyskytuje přes 90 % případů z celkového počtu na naší planetě. Nejhorší situace je v Africe a jihovýchodní Asii. S problémem tuberkulózy se však potýkají i ekonomicky vyspělé země, ve kterých se objevuje již nejen u sociálně slabších jedinců. Klíčovou roli v těchto zemích hraje zejména narůstající migrace ze zemí s vysokou incidencí tuberkulózy a rovněž i zvyšující se podíl HIV pozitivních jedinců. Výzkumy potvrdily, že člověk infikovaný virem HIV je 70x náchylnější k infekci tuberkulózou a člověk postihnutý rozvinutou formou AIDS dokonce je až 170x náchylnější.¹

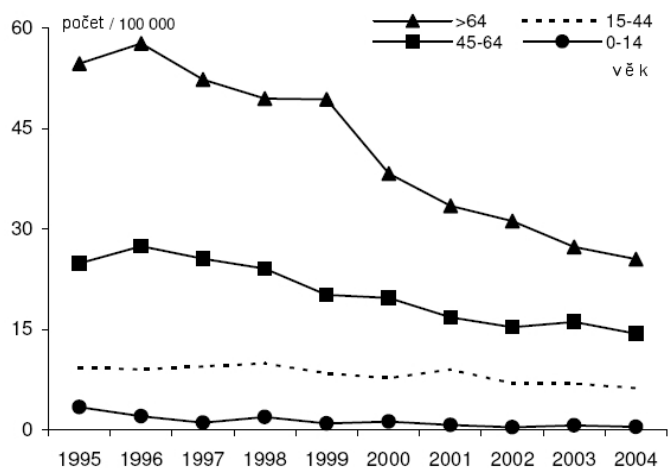
Jelikož jsem se o epidemiologii výskytu tuberkulózy v celosvětovém měřítku zmínil již ve své diplomové práci, zde bych chtěl poukázat na situaci v České republice. Česká republika patří mezi země s nízkou incidencí tuberkulózy. Lze říci, že představuje jakousi pomyslnou hráz mezi příznivou situací na západě a zhoršující se situací na východě a na jihu. Velký význam pro snížení počtu incidence tuberkulózy má centrální Registr tuberkulózy (sídlicí v pražské Fakultní nemocnici Bulovka), který v České republice funguje již od šedesátých let. Od této doby došlo k významnému poklesu incidence tuberkulózy, a to ze 160 případů na 1 000 000 obyvatel v roce 1960 na méně než 20 případů na 1 000 000 obyvatel

koncem osmdesátých let. Od této doby je u nás situace stabilizována s mírně klesající tendencí.^{1, 3}

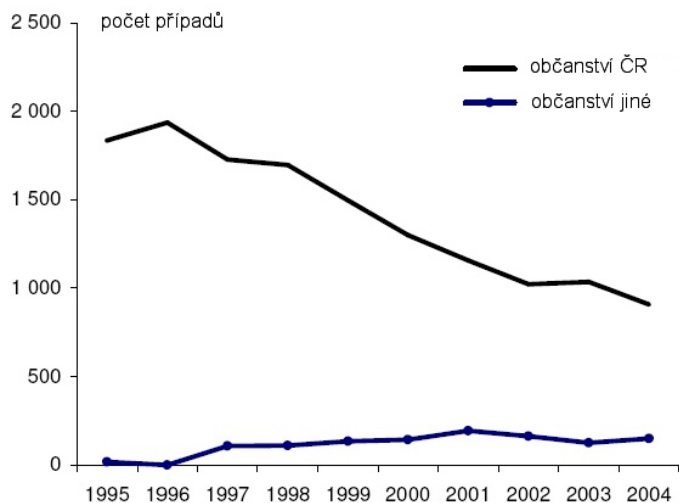
Graf č.1: Počet případů TBC v ČR na 100 000 obyvatel z hlediska pohlaví, 1995-2004⁴



Graf č.2: Počet případů TBC v ČR na 100 000 obyvatel z hlediska věku, 1995-2004⁴



Graf č.3: Počet případů TBC v ČR z hlediska občanství, 1995-2004⁴



Z výše uvedených grafů vyplývá, že tuberkulóza v České republice postihuje více muže než ženy. Z hlediska věku, bez ohledu na pohlaví, lze říci, že s rostoucím věkem roste i počet případů tuberkulózy. Nejvyšších hodnot dosahuje u jedinců starších 64 let. Z pohledu občanství jedinců postižených tuberkulózou výzkumy prokázali, že počet nemocných s občanstvím českým se snižuje, naproti tomu počet nemocných cizinců má mírně zvyšující se tendenci. ⁴

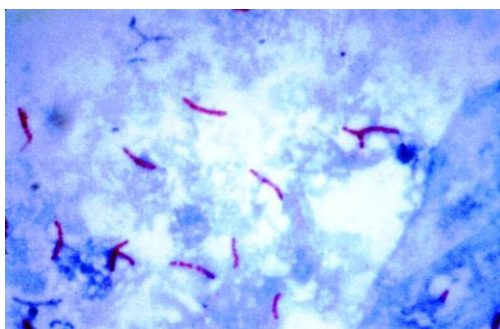
K dosažení stabilizace incidence tuberkulózy, event. snížení počtů případů v globálním měřítku, zavedla WHO program DOTS (Directly Observed Treatment Short-course). Velkou úlohu hraje také v boji proti rozvoji multirezistentních kmenů mykobakterií. Tento program byl zaveden již ve 183 zemích a od roku 1995 byla pomocí něho řízena terapie u více než dvaadvaceti milionech pacientů. DOTS zahrnuje pět základních pravidel: ²

- spoluúčast vlády na kontrole incidence tuberkulózy
- diagnostika mikroskopickým rozbořením sputa
- dostupná terapie antituberkulotiky první volby
- dohled nad dodržáním standardní terapie
- řádný záznam o průběhu terapie

1.1.2 PŮVODCE TUBERKULÓZY

Tuberkulóza je vyvolaná patogenními mykobakteriemi: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*. V České republice se jako vyvolávající agens uplatňuje prakticky pouze *Mycobacterium tuberculosis*. Ostatní druhy se vyskytují hlavně v oblastech Afriky a jihovýchodní Asie. Existují i tzv. atypická mykobakteria: *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium-intracellulare*.^{3, 5}

Obr.č.1: Fotografie *Mycobacterium tuberculosis*, barvení dle Ziehl-Neelsena, zvětšeno tisíckrát⁶



Mycobacterium tuberculosis byla objevena německým vědcem a nositelem Nobelovy ceny Robertem Kochem, který svůj objev prezentoval 24. března 1882.⁷

Z mikrobiologického hlediska se jedná o grampozitivní nepohyblivé tyčky o velikosti 0,3-1,5 μm , jsou acidorezistentní, aerobní a pomalu rostoucí. Rovněž vykazují značnou odolnost vůči suchu a chladu, což jim umožňuje přežít i mimo hostitele.^{8, 9}

V těle infikovaného jedince se mohou mykobakteria nacházet ve dvou základních stavech: latentní formě a aktivní formě. Mitchison je rozdělil podle odlišných charakteristik a projevů do čtyř skupin:¹⁰

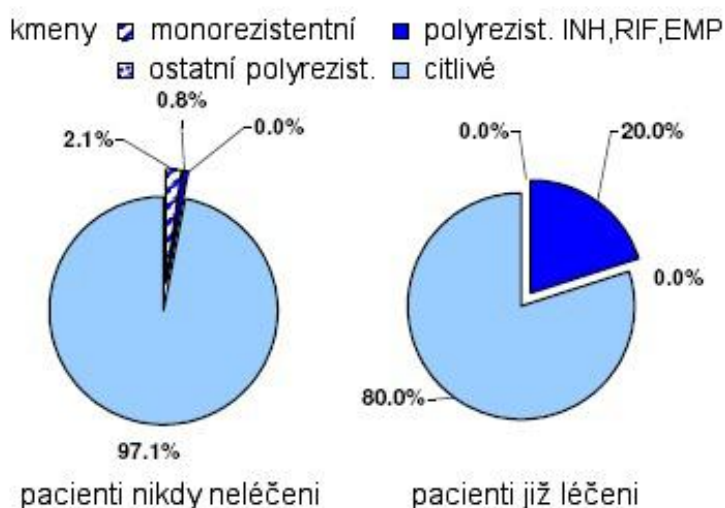
- metabolizující a rychle rostoucí formy
- polospící formy v kyselém intracelulárním prostředí
- polospící formy v nekyselém intracelulárním prostředí
- spící formy (tzv. latentní fáze)

Mykobakterie je chráněna velice odolným hydrofobním obalem, který tvoří tři základní části: plasmová membrána, buněčná stěna a pouzdro. Nejodolnější část představuje právě buněčná stěna, která se díky dvěma vrstvám vyznačuje vysokou nepropustností. Tvoří ji

tzv. mykolyl arabinogalaktan-peptidoglykanový komplex. Skládá se z vrstvy peptidoglykanu, který je pomocí diglykosylfosforylového můstku spojený s arabinogalaktanem vázajícím rozlehlé mykolové kyseliny, to jsou α -alkyl- β -hydroxy mastné kyseliny obsahující 60 až 90 atomů uhlíku.⁹

Velice nebezpečným projevem u mykobakterii jsou mutace. Náhodnými mutacemi v bakteriálním chromozomu se tvoří mutanty. Vznikají tak rezistentní kmeny bez přítomnosti jakéhokoli antituberkulotika. V průběhu terapie, při nedodržení léčebného režimu, se tyto kmeny vyselektují a pomnoží. U těchto kmenů pak může docházet k dalším mutacím a vznikají tzv. dvojité-rezistentní mutanty. Z klinického hlediska patří mezi nejzávažnější multirezistence na isoniazid a rifampicin.⁹

Obr. 2: Profil vzniku rezistence u terapie pomocí INH, RIF, EMP v ČR, 2004⁴



Zajímavé výsledky přinesl výzkum na University of California Berkeley, který dokázal, že genetická mutace může vést ke vzniku tzv. supervirulentních *Mycobacterium tuberculosis*. Bylo dokázáno, že po inaktivaci určitého úseku DNA mykobakterii vzniká nový patogen se schopností rychlejšího množení. Toto zjištění bylo překvapivé, jelikož byla inaktivována tzv. virulentní část DNA a očekával se spíše opačný výsledek, tedy snížení virulence.¹¹

1.1.3 PŘENOS INFEKCE TUBERKULÓZY

Hlavním zdrojem infekce tuberkulózy je nemocný. Zdravý jedinec se nakazí ve většině případů inhalací kontaminovaných kapének, které se dostávají do vzduchu kýchním, kašláním nebo jen mluvením. Z epidemiologického hlediska tvoří nejzávažnější skupinu mikroskopicky pozitivní pacienti. Jedinec, u kterého se prokáže mikroskopicky pozitivní sputum na tuberkulózní bacily, totiž vykašlává řádově $10^4 - 10^5$ mykobakterii v 1 mililitru sputa. Oproti tomu jedinec, u kterého byla pozitivita potvrzena pouze kultivačně a který byl mikroskopicky negativní, má v 1 mililitru sputa bacilů tuberkulózy řádově $10^2 - 10^3$ (tedy 100x méně). Lze tedy říci, že diagnostika pomocí kultivace je 100x citlivější než diagnostika pomocí mikroskopie. Domnívat se, že bychom se nemohli nakazit od jedince, který je pozitivní jen kultivačně, by bylo však mylné. Pouze pravděpodobnost, že se tak stane je velmi malá.^{1,5}

Je důležité dodat, že infekci šíří jen jedinci s aktivní formou tuberkulózy, někdy také označovanou jako otevřená forma plicní tuberkulózy. To znamená, že mikroskopická diagnostika pro určení, zda je pacient nakažlivý, nestačí. Aktivní mykobakterie lze dokázat pouze kultivačně. Velkou roli hraje také délka expozice. Jako rizikový se uvádí kontakt s osobou s TBC v uzavřeném prostoru trvající déle než 5 hodin. V návaznosti na tento fakt představuje v ekonomicky rozvinutých zemích velké riziko zejména hromadná doprava, kdy se široké spektrum lidí dostává do delšího kontaktu v uzavřeném prostoru.¹

Lze tedy konstatovat, že významnou roli v přenosu tuberkulózy hrají tyto čtyři faktory:⁸

- míra, jakou je infikovaná osoba schopna kontaminovat vzduch
- prostředí, ve kterém se kapénky šíří
- délka expozice druhé osoby
- virulence toho konkrétního kmenu mykobakterie

Dále je možným zdrojem infekce i nemocný s mimoplicní tuberkulózou, kdy jedinec přichází do styku se sekretem z TBC ložiska (například hnis z píštěle) či přímo s tkání infikovanou TBC (chirurg či patolog).¹

Podezřelého či prokazatelně infekčního pacienta je nutné ihned izolovat, aby se zabránilo dalšímu přenosu. U pozitivních jedinců je nutné vyšetřit tzv. kontakty – osoby, které byly s nemocným v déletrvajícím nebo opakovaném kontaktu.¹

1.1.4 DIAGNOSTIKA TUBERKULÓZY

Diagnózu TBC stanovuje odborný lékař - pneumolog. V rámci tohoto stanovení je nutné odlišit onemocnění, která mohou napodobovat tuberkulózní nález. Mezi nejčastější patří: netuberkulózní mykobakteriózy, onemocnění *Yersinia pseudotuberculosis*, sarkoidóza, chronická granulomatóza, maligní lymfogramulom, ale i lehká zánětlivá onemocnění plic.³

Pokud na základě klinického obrazu a výsledků vyšetření zobrazovacími metodami (rentgen, CT) vznikne podezření na plicní či mimoplicní tuberkulózu, je vždy nutný odběr materiálu na mikrobiologické vyšetření. Zlatým standardem v diagnostice jsou stále: mikroskopické vyšetření (užívá se barvení dle Ziehla-Neelsena) a kultivace. Nejčastějším infekčním materiálem je sputum. U vykašlávajících pacientů se odebírá ráno nalačno nebo se odebírá po dobu jedné hodiny, tzv. hodinové sputum. U nevykašlávajících pacientů se získává tzv. indukované sputum. Jedná se o sputum získané po předchozí inhalaci 10 % roztoku NaCl. Moderní metody v diagnostice využívají tzv. genetické sondy, které jsou schopny ve vzorku identifikovat genetický materiál daného mykobakteria. Tento typ vyšetření je vysoce senzitivní, ale náročné z hlediska finančního i z hlediska způsobu provedení. Nežádoucí je falešně pozitivní nález, ke kterému může dojít při kontaminaci vzorku pouze jedním mykobakteriem.¹

V některých případech se doporučuje vyšetření imunitní odezvy tzv. tuberkulinový test. Tuberkulin je očištěná bílkovina *Mycobacterium tuberculosis*, ta se vstříkne pod kůži, reakce se odečítá za 72 hodin (vzhledem k očkování celé populace je tento test v České republice pouze orientační).³

Mezi diagnostické metody patří i histologické vyšetření. Jedná se o nepřímou diagnostickou metodu. Často se podaří prokázat pouze granulační tkáň s přítomností epiteloidních a obrovských mnohojaderných buněk, označovaných také jako Langhansových (tvoří je splynuté změněné fagocytující makrofágy), ty jsou však společné i pro jiný granulomatózní zánět. Jen kazeózní nekróza se vyskytuje pouze u TBC, je odlišná od ostatních nekrot. I u těchto vyšetření je nutno opět zařadit mikroskopickou a kulturační diagnostiku, jen ty poskytnou přímý důkaz TBC. Díky nim přesně identifikujeme mykobakteriální kmen a vyšetříme citlivost vůči antituberkulotikům.¹

V úvahu je nutné brát i epidemiologické souvislosti a predisponující faktory (diabetes mellitus, imunodeficience, imunosuprese)³

1.1.5 PATOGENEZE A SYMPTOMY TUBERKULÓZY

Následky infekce tuberkulózou jsou závislé na množství a virulenci mykobakterii, na opakování styku s infekčním zdrojem a na stavu imunitního systému jedince. Při styku s infekcí může organismus reagovat trojím způsobem: ³

- organismus není infikován
- organismus je infikován, ale nedochází k manifestaci onemocnění
- vzniká manifestní onemocnění, důvodem bývá velké množství a vysoká virulence mykobakterii a nedostatečný stupeň imunity

V těle jsou inhalované mykobakterie označeny T-lymfocyty pomocí antigenů. Takto označené mykobakterie jsou pohlcovány plicními makrofágy. Ty je však nejsou schopny všechny zničit, některé mykobakterie přežívají a po smrti makrofága jsou opět uvolněny. To je příčinou velice rychlého pomnožení mykobakterii a jejich následovného rozšíření lymfou nebo krevní cestou do ostatních orgánů. Jsou tak postiženy zejména plíce, mozek, ledviny a kosti.⁸

Manifestní onemocnění obvykle dělíme na primární a postprimární. Primární vzniká při prvním styku organismu s tuberkulózní infekcí. Základním znakem je postižení regionálních dutin, které odpovídají místu proniknutí infekce do organismu. Asi nejčastěji se s ním setkáváme u dětí. Vývoj onemocnění je v těchto případech příznivý s tendencí ke spontánnímu hojení. Častými projevy jsou: zvýšená teplota, nechutenství a snížená tělesná aktivita. U dospělých se jedná o tzv. pozdní primoinfekci. Uzlinová složka nebývá výrazná a onemocnění má od počátku tendenci k progresi. Kumulace mykobakterii v makrofázích způsobí vznik tuberkulózních uzlíků (primárního komplexu). V mnoha případech probíhá asymptomaticky. ^{3, 5}

Postprimární tuberkulóza vzniká přímo v návaznosti na primární formu nebo i po několika letech reaktivací starého kalcifikovaného primárního ložiska v době oslabení imunity. Podle časového odstupu mezi primární a postprimární infekcí lze rozlišovat časnou a pozdní postprimární formu. Časná vzniká do jednoho roku po primoinfekci a projevuje se zejména jako tuberkulózní meningitida, memingoencefalitida, akutní miliární tuberkulóza a exsudativní pleuritida. Pozdní postihuje kosti a klouby za jeden až dva roky po primoinfekci, močové cesty a genitální systém za tři roky a ledviny za deset a více let po primoinfekci. V průměru 80% případů tvoří plicní tuberkulóza a 20 % mimoplicní. K příznakům plicní formy patří dlouhotrvající kašel, febrilie, únavnost, hubnutí a chrlení krve. ^{3, 5}

1.1.6 TERAPIE TUBERKULÓZY V SOUČASNOSTI

Moderní strategie v terapii tuberkulózy byla vypracována Světovou zdravotnickou organizací v devadesátých letech a dodnes se celosvětově používá v praxi. Spočívá ve standardizovaných krátkodobých chemoterapeutických režimech aplikovaných za individuální péče o každého nemocného, jde o již výše zmiňovaný program DOTS.³

Mezi základní antituberkulotika zařazujeme isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamid (PZA), streptomycin (STM) a etambutol (EMB). Obecně lze říci, že terapeutický režim aktivní formy tuberkulózy se zahajuje trojkombinací INH, RIF, PZA a poté dvoukombinací INH a RIF. Někdy také hovoříme o tzv. iniciální fázi, která trvá minimálně dva měsíce hospitalizace, a o tzv. pokračovací fázi ambulantní, která trvá čtyři až šest měsíců. U lidí s latentním stadiem (tuberkulinový test pozitivní, ale žádné klinické příznaky) se doporučuje chemoterapie spočívající v každodenním užívání INH půl roku.^{3,8}

WHO rozděluje pacienty trpící tuberkulózou do čtyř kategorií:^{3,12}

- pacienti s nově zjištěnou TBC plicní i mimoplicní, terapie v iniciální fázi zahrnuje kombinaci INH, RIF, PZA, EMB nebo INH, RIF, PZA, STM a v pokračovací fázi kombinaci INH a RMB

- nemocní, u nichž z nějakého důvodu (přerušení terapie apd.) léčba selhala a pacienti s recidivou tuberkulózy, terapie spočívá v podávání INH, RIF, PZA, EMB a STM po dva měsíce, dále INH, RIF, STM, EMB jeden měsíc a nakonec pětiměsíční pokračovací fáze INH, RIF, EMB

- bakteriologicky neověřené nezávažné formy plicní i mimoplicní tuberkulózy, v těchto případech se podává INH, RIF, PZA po dva měsíce

- chronicky nemocní tuberkulózou, bakteriologicky pozitivní i po dokončení terapie v druhé kategorii, léčba je v těchto případech přísně individualizovaná a provádí se ve specializovaných ústavech

Kombinovaná terapie je nutná především proto, že mykobakterie rychle získávají rezistenci vůči antituberkulotikům a kombinací léčiv tak snížíme možnost přežití vyselektovaných rezistentních populací. Důvodem je také heterogenita mykobakterií, některá jsou uložena extracelulárně, jiná intracelulárně, rozdíly jsou i v metabolické aktivitě.¹

Je nutné také zdůraznit kontrolu nad dodržováním terapie, pokud totiž terapeutický režim vede k úspěšnému vyléčení, největší hrozbou je noncompliance pacienta.¹³

1.1.7 PREVENCE TUBERKULÓZY

Prevence proti TBC, označované jako BCG vakcína, je očkování oslabeným kmenem *Mycobacterium bovis*, tzv. Bacillus Calmette-Guérin. Po očkování dojde ke vzniku imunitní odpovědi, jedná se o typ IV - buňkami zprostředkovaná. Protilátková imunita zde prakticky nehraje roli. Vakcinace nesníží riziko vzniku onemocnění, ale zabraňuje hlavně vzniku generalizovaných forem. U nás je dosud povinná a provádí se do pěti dnů po narození. V situaci vysokého rizika infekce chránila děti proti závažným formám tuberkulózy. V minulých letech se ale u nás projevíly spíše nevýhody očkování, jako kostní či jaterní komplikace.^{1, 3, 12}

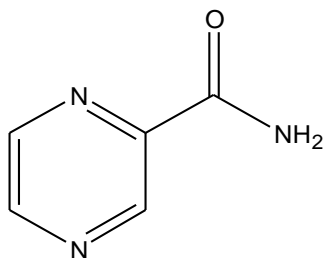
V současnosti se pracuje na nových typech vakcín. Mezi ně patří atenuované kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, vakcinace proteinovými subjednotkami nebo vakcíny na bázi nukleových kyselin.⁹

V některých případech je preventivně vhodná chemoprophylaxe. Provádí formou monoterapie 300 mg INH denně po dobu šesti měsíců a užívá se v případech rizikových situací provázených vzestupem tuberkulinové reakce. Především jde o děti, pacienty s chronickou renální insuficiencí, diabetem, AIDS apd.¹²

1.2 ANTITUBERKULOTIKA

1.2.1 ANTITUBERKULOTIKA PRVNÍ VOLBY

Pyrazinamid



Charakteristika:

Pyrazinamid, amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny, je analogem nikotinamidu. U této molekuly byly prováděny mnohé pokusy o zesílení účinku. Bohužel zatím žádná s těchto modifikací se neuplatnila v praxi. Pyrazinamid je vhodný zejména v iniciální fázi terapie tuberkulózy, k urychlení usmrcení replikujících a částečně nereplikujících kmenů *Mycobacterium tuberculosis* nebo při postižení CNS pro jeho dobrý průnik přes hematoencefalickou bariéru. Působí baktericidně. Často se používá v kombinaci s INH a RIF. Jeho indikace zahrnují jak plicní, tak i mimoplicní tuberkulózu. Pyrazinamid se dobře absorbuje ze zažívacího traktu s rozsáhlou distribucí do tělesných tkání. U tuberkulózních bacilů se vyvíjí rezistence vůči této látce velice snadno, ale zkřížená rezistence vůči isoniazidu nebo dalším antituberkulotikům se nevyskytuje.^{14, 15, 16}

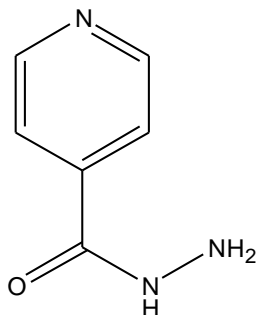
Mechanismus účinku:

V prostředí neutrálního pH je neaktivní, aktivní je až v prostředí slabě kyselém. V mykobakterii je enzymem amidasou transformován na účinnou formu pyrazinkarboxylovou kyselinu. Vlastní mechanismus spočívá v narušování membrán, čímž snižuje energetickou potenci mykobakterii.^{16, 17}

Nežádoucí účinky:

Mezi hlavní nežádoucí účinky pyrazinamidu patří hepatotoxicita (objevuje se u 1-5 % pacientů), nauzea, zvracení, léková horečka a hyperurikémie.¹⁵

Isoniazid



Charakteristika:

Isoniazid, hydrazid kyseliny isonikotinové, je pravděpodobně nejvíce užívané antituberkulotikum. U aktivního, klinicky se projevujícího, onemocnění, je podáván společně s EMP, RIF, STM nebo PZA. Na rostoucí kmeny mykobakterii působí baktericidně, na nerostoucí jen bakteriostaticky. Isoniazid se dobře absorbuje se zažívacího traktu a poměrně snadno difunduje do všech tělesných tkání a tekutin. Působí jak na intracelulární, tak na extracelulární mykobakterie. Zkřížená rezistence s ostatními antituberkulotiky se nevyskytuje. Pokusy o jeho modifikaci zatím nevedly k zesílení jeho účinku.^{14, 15, 17}

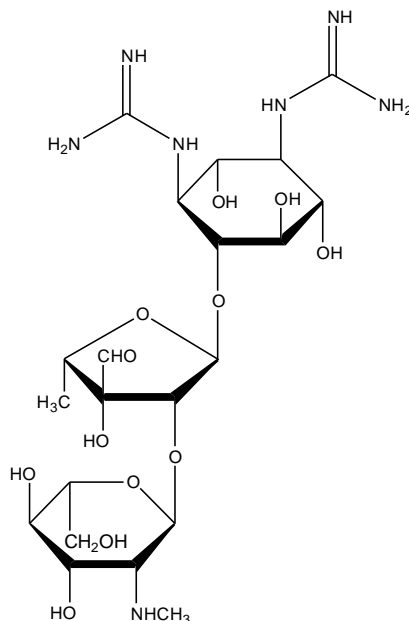
Mechanismus účinku:

Účinek isoniazidu spočívá v interferenci při syntéze mykolových kyselin. Ovlivňuje enzym mykolátsyntetasu a tím narušuje tvorbu buněčných stěn mykobakterii.^{15, 16}

Nežádoucí účinky:

Incidence a závažnost nežádoucích účinků závisí na dávce a délce podávání. Mohou se projevit jako alergická reakce: horečka, kožní vyrážky a hepatitida. Mnohem závažnější je však jeho přímá toxicita, která se projevuje u 10-20 % pacientů jako periferní nebo centrální neuritida. Tyto účinky jsou vysvětlovány relativním nedostatkem pyridoxinu, který je snad důsledkem kompetice INH a pyridoxal fosfátu o enzym apotryptofonásu. Mohou se tedy objevit projevy jako: nespavost, retence moče, křeče nebo psychotické epizody. Těmto problémům předcházíme podáváním velkých dávek pyridoxinu, který neinterferuje s antituberkulotickými účinky INH.¹⁵

Streptomycin



Charakteristika:

Streptomycin, přesněji streptomycin A, patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik, je produkován mikroorganismem *Streptomyces griseus*. Molekula se skládá ze tří hlavních částí streptidin, streptáza a N-methyl-L-glukosamin. Díky přítomnosti dvou silně bazických guanidinových skupin a slaběji bazické methylaminoskupině je streptomycin poměrně silnou trojsytnou bází. Užívá se ve formě síranu. Je podáván intramuskulární nebo velice zřídka intrathekální cestou. Streptomycin působí hlavně na extracelulární tuberkulózní bacily, jelikož do buněk proniká jen asi 10 % z podané dávky. Používá se u jedinců s těžkými, život ohrožujícími formami tuberkulózy, a to zvláště u meningitidy, miliární diseminace a těžké orgánové tuberkulózy. Streptomycin se rovněž používá v terapii neobvyklých bakteriálních infekcí (brucellosa, tularemie).^{14, 15, 16}

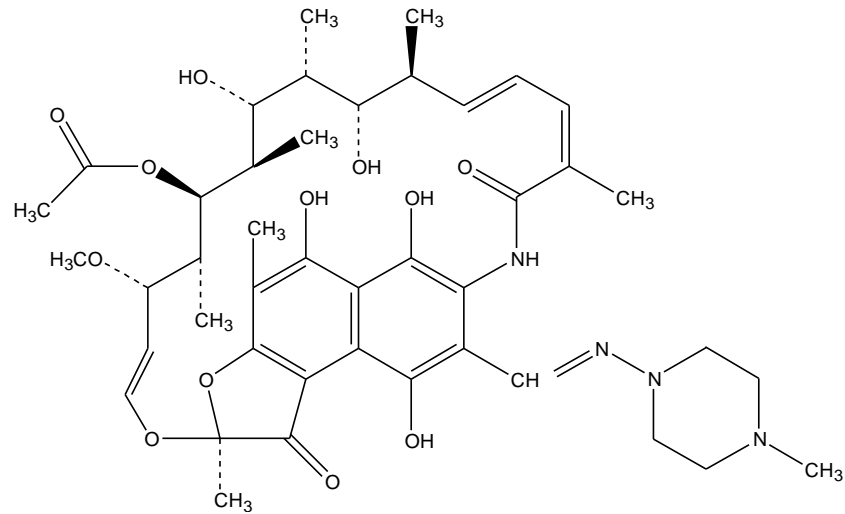
Mechanismus účinku:

Spočívá v penetraci do vnitřní membrány *Mycobacterium tuberculosis* a následné vazbě na 30s podjednotku ribozomů. Tím je narušena proteosyntéza.¹⁵

Nežádoucí účinky:

Toxicita podávaného streptomycinu se projevuje jako poškození osmého nervu, zejména jako dysfunkce labyrintu, vedoucí k neschopnosti udržet rovnováhu, a jako hluchota.¹⁵

Rifampicin



Charakteristika:

Patří do skupiny ansamycinových antibiotik, jejíž nejvýznamnější podskupinou jsou rifamiciny, které byly izolovány z *Nocardia mediterranei*. Z chemického hlediska je pro ně charakteristický makrocyclus obsahující laktamovou vazbu a naftochinonové seskupení. Prvním polosyntetickým derivátem používaným v praxi byl právě rifampicin, který se v terapii používá dodnes. V oblasti terapie tuberkulózy se používá zejména v kombinacích s ostatními antituberkulotiky. Při současném podávání sulfonu je rifampicin účinný i u lepry. Obvykle se podává perorálně s dobrou absorpcí z trávicího traktu.^{14, 15, 16}

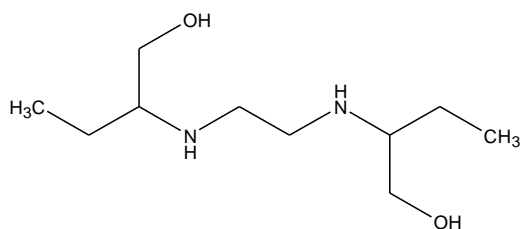
Mechanismus účinku:

Rifampicin se silně váže na DNA-dependentní RNA polymerázu, a tím inhibuje syntézu RNA. Lidskou RNA polymerázu rifampicin neovlivňuje. Při současném podávání INH působí na mykobakterie baktericidně. Velice snadno proniká do buněk, proto může usmrcovat i intracelulárně umístěné mikroorganismy.¹⁵

Nežádoucí účinky:

Při podávání rifampicinu se může objevit neškodné oranžové zbarvení moči, potu či slz. Nežádoucí účinky se objevují spíše zřídka. Mohou to být vyrážky, trombocytopenie nebo poruchy funkce jater. U velmi malé skupiny pacientů se objevila i fatální nefritida, proto je nutné před podáváním ověřit správnou funkci ledvin. Rifampicin je induktorem jaterních enzymů, zvyšuje tedy metabolickou eliminaci antikoagulancií a kontraceptiv.^{15, 17}

Ethambutol



Charakteristika:

Ethambutol je derivátem ethylendiaminu. Jedná se o opticky aktivní sloučeninu typu aminoalkoholu se dvěma izolovanými chirálními atomy uhlíku. Z tohoto hlediska je účinný pouze pravotočivý izomer *S,S*-(+)-izomer, levotočivý izomer je neúčinný a další stereoizomery jsou toxické. Ethambutol je účinný pouze na kmeny mykobakterií, na ostatní bakterie je inaktivní. I zde je pro rychlý vznik rezistence nutné použití v kombinaci s ostatními antituberkulotiky. Působí bakteriostaticky. ^{14, 16, 17}

Mechanismus účinku:

Ethambutol polymerizuje arabinosu v buněčné stěně mykobakterií, místem účinku je enzym arabinofuranosyltransferasa. Výsledkem tohoto působení je poškozená integrita buněčné stěny. ¹⁶

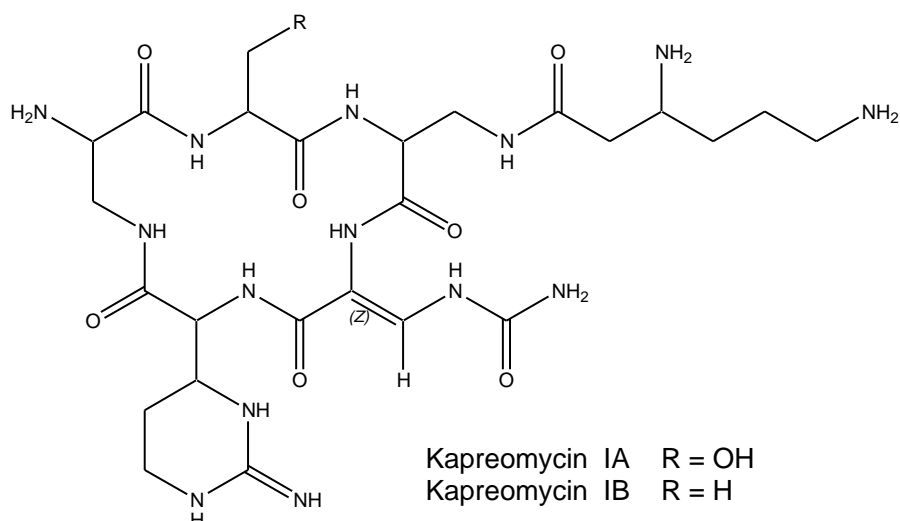
Nežádoucí účinky:

Nejzávažnější je retrobulbární neuritida s poruchou vnímání zelené barvy. Během léčby se doporučují oftalmologické kontroly. Tyto nežádoucí účinky se objevují v závislosti na podané dávce, pravděpodobnost jejich vzniku se zvyšuje při snížené funkci ledvin. ^{15, 17}

1.2.2 DALŠÍ ANTITUBERKULOTIKA

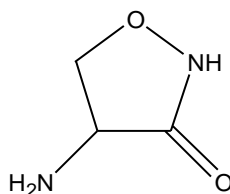
Jejich použití je spjato s větším výskytem nežádoucích účinků, proto se používají jen ve výjimečných případech, kdy antituberkulotika první řady selhávají.

Kapreomycin



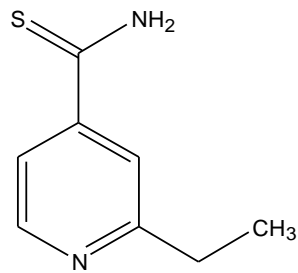
Kapreomycin patří do skupiny peptidových antibiotik. Získává se ze *Streptomyces capreolus*. Denní intramuskulární podání 1g vede k hladinám v krvi ve výši 10 µg/ml nebo vyšším. Tato koncentrace působí *in vitro* inhibičně na řadu mykobakterií. Při podávání se často projevuje jeho toxicita jako například: poškození funkce ledvin, což způsobí retenci dusíku v těle a poškození osmého nervu, vedoucí k hluchotě. Pro zmírnění toxicity kapreomycinu se užívá denní dávka (1g) dvakrát až třikrát týdně.^{14, 15}

Cykloserin



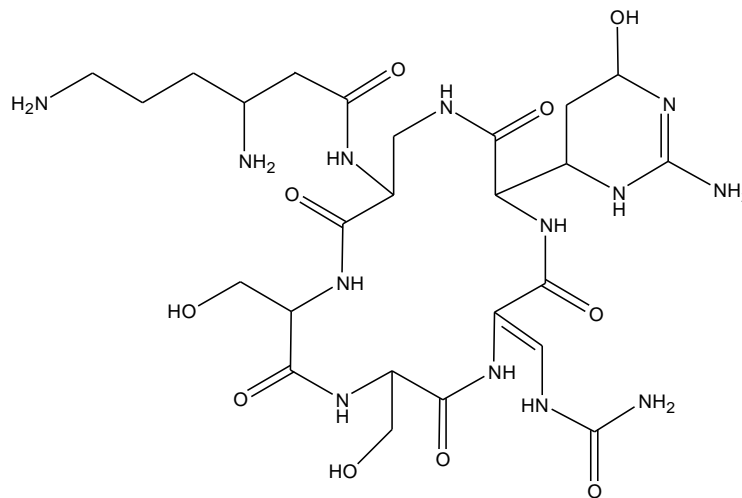
Cykloserin je antibiotickým analogem *D*-alaninu. Mechanismus účinku spočívá v inhibici alaninracemasy. I zde se objevují poměrně závažné nežádoucí reakce jako dysfunkce centrálního nervového systému nebo různé psychotické reakce. Pro zmírnění těchto projevů se podává fenytoin.^{14, 15}

Ethionamid



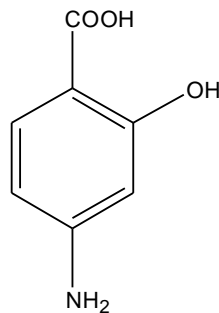
Jedná se o velice stabilní látku, která je takřka nerozpustná ve vodě. Abychom dosáhly potřebného antituberkulotického účinku, musíme použít vyšších koncentrací, což je doprovázeno výskytem toxických projevů: silně dráždí žaludek a vyvolává neurologické poruchy. Ze strukturálního hlediska vykazuje podobnost s isoniazidem, přesto vznikající rezistence není zkřížená.^{14, 15}

Viomycin



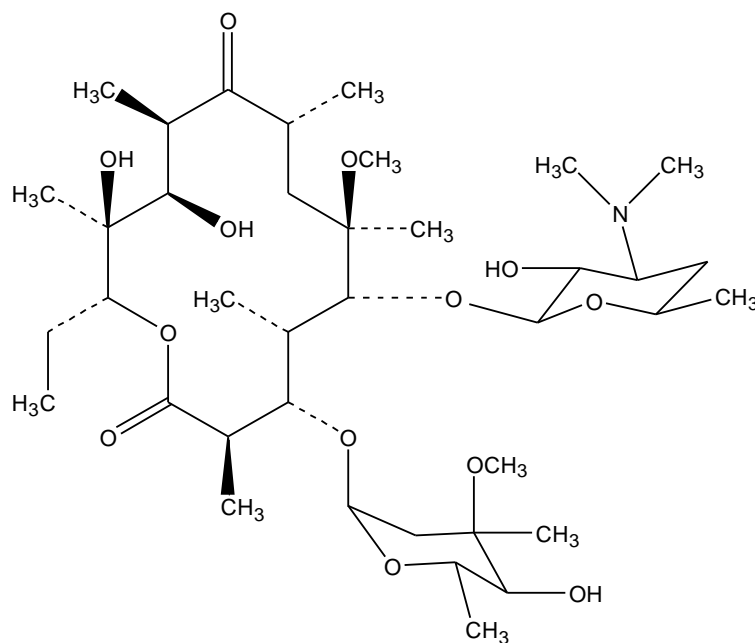
Viomycin je komplexní bazický polypeptid, připravovaný jako neutrální sulfát, který je rozpustný ve vodě. Toto antibiotikum je produkováno určitými kmeny Streptomycet. Jeho použití jako antituberkulotika je provázeno mnohými problémy, velice rychle se rozvíjí rezistence mykobakterií a také toxické projevy jako poškození ledvin a osmého nervu.^{14, 15}

Kyselina p-aminosalicylová



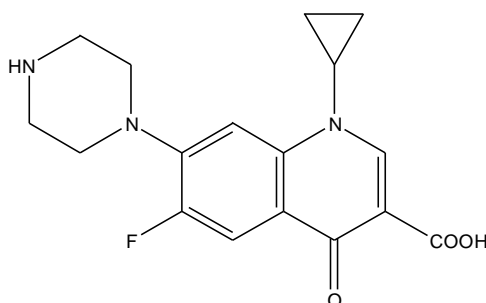
Z různých derivátů kyseliny salicylové a benzoové má z hlediska antituberkulotické aktivity největší účinek p-aminosalicylová kyselina. Strukturálně se podobá p-aminobenzoové kyselině. Stejně jako sulfonamidy i tato látka narušuje syntézu kyseliny listové. V dnešní době je její použití velmi sporadické, jelikož je nahraditelná jinými antituberkulotiky s méně výraznými nežádoucími účinky. Kyselina p-aminosalicylová způsobuje bolest kloubů, neurologické poruchy, různé gastrointestinální potíže a vzácněji i poruchy ledvin a jater.^{14, 15}

Klarithromycin



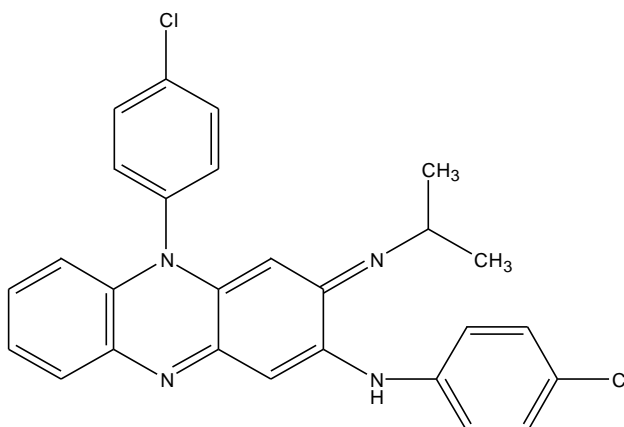
Jedná se o makrolidové antibiotikum. Klarithromycin se váže na 50s podjednotku ribozomů a tím inhibuje syntézu proteinů. Je používán výhradně v kombinacích s ostatními antituberkulotiky.^{9, 14}

Ciprofloxacin



Ciprofloxacin se řadí do skupiny antibiotik chinolonů, resp. fluorochinolonů. Inhibuje DNA-gyrasu a DNA-topoizomerasu IV. Ve výsledném efektu působí baktericidně. Je používán opět pouze v kombinacích. Vedle ciprofloxacinu se používají i jiné fluorochinolony: ofloxacin, moxifloxacin.^{9, 14}

Klofazimin

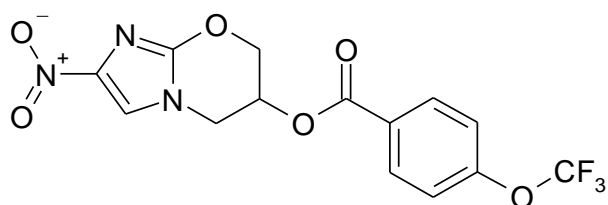


Spektrum účinku předurčuje klofazimin k léčbě lepry rezistentní na dapson a také k terapii tuberkulózy způsobené atypickými kmeny mykobakterii, zejména u imunodeficitních pacientů. Z chemického hlediska se jedná o fenazinové barvivo. Jako antituberkulotikum se používá pouze v kombinacích.^{14, 16}

1.2.3 POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA

V současné době je vývoj nových antituberkulotik založen na definici jednotlivých kroků biosyntézy mykobakteriální buněčné stěny (glykosylace, biosyntéza mastných kyselin a kyseliny diaminopimelové, isocitrátlyasa), na důkladném zmapování genomu *Mycobacterium tuberculosis* nebo v detekci genů ovlivňujících latenci a virulenci. V současné době jsou v různých stádiích vývoje další látky, které vykazují antituberkulotickou aktivitu a které by mohly v budoucnu přispět v terapii tuberkulózy. Mezi ně patří například: ¹⁶

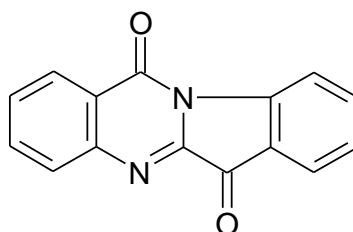
Nitroimidazofurany, nitroimidazopyrany



PA-824

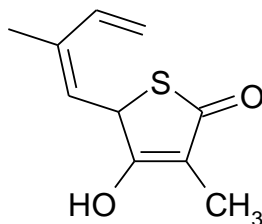
Nitroimidazofurany se používají v oblasti chemoterapie rakoviny. Byla však také prokázána jejich antituberkulotická aktivita, pro svoje mutagenní vedlejší účinky se v této oblasti neprosadily. Jinak tomu bylo u příbuzných látek, u bicyklických nitroimidazopyranů. Nejvýznamnější z těchto látek je látka označovaná PA-824. PA-824 je účinná jak na rostoucí, tak na latentní kmeny mykobakterii. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin a syntézy lipidů buněčné stěny.⁹

Tryptanthrin



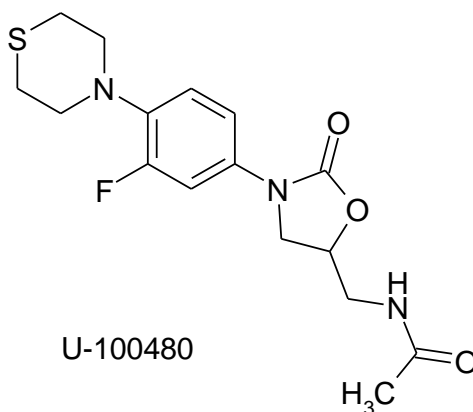
Tryptanthrin je účinný v potlačování multirezistentních kmenů mykobakterii. Nebyla však ještě ověřena jeho toxicita. Jedná se o indolylchinazolinový alkaloid.⁹

Thiolaktomycin



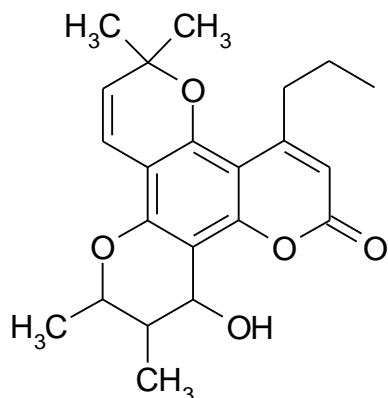
Strukturálně se jedná o thiolakton. Tato látka vykazuje antituberkulotickou aktivitu tím, že narušuje buněčnou stěnu mykobakterií. Mechanismem je inhibice biosyntézy mykolových kyselin. Její minimální inhibiční koncentrace (MIC) je 5 µg/ml. I zde však ještě chybí informace o její toxicitě jak *in vitro*, tak *in vivo*. Nelze tedy ještě s jistotou říci, jestli její MIC bude v přijatelných mezích z hlediska nežádoucích účinků.⁹

Oxazolidinony



Tyto látky jsou schopné inhibovat syntézu bílkovin. Jsou tedy účinná proti mnoha bakteriím. Látka označovaná U-100480 je aktivní i proti *Mycobacterium tuberculosis*. Při testech na laboratorních potkanech však byla prokázána její toxicita. V současnosti se pracuje na obměnách této struktury.⁹

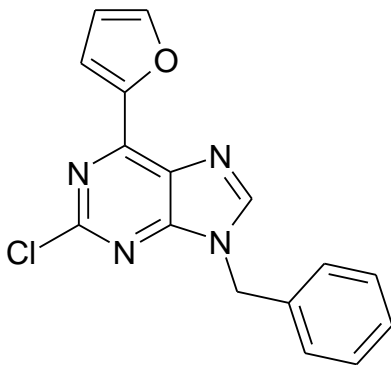
Benzopyran-2-ony



Calanolid A

Původně byly tyto látky testovány na aktivitu proti viru HIV. U některých však byla prokázána i antituberkulotická aktivita. Jednou z těchto látek je calanolid A.⁹

Puriny



9-benzyl-2-chlor-6-(furan-2-yl)-purin

V neposlední řadě vykazují antituberkulotickou aktivitu i 9-benzylpuriny substituované v polohách 2, 6 a 8. Mezi látky s největší aktivitou patří 9-benzylpurin substituovaný chlorem v poloze 2 a furan-2-ylem v poloze 6.⁹

2 CÍL RIGORÓZNÍ PRÁCE

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciální antimykobakteriální, doplňkově i antifungální aktivitou a inhibiční aktivitou na fotosyntézu. Tato rigorózní práce je dílčím příspěvkem k řešení dlouhodobých výzkumných úkolů katedry.¹⁸

V rámci své rigorózní práce jsem se zaměřil na přípravu biologicky (antimykobakteriálně, doplňkově i antifungálně a herbicidně) aktivních derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Tato práce navazuje na výsledky prezentované na fakultním kole Studentské vědecké konference v roce 2005¹⁹ na moji diplomovou práci z roku 2006²⁰. Některé z mých výsledků byly také zveřejněny formou plakátových sdělení na odborných konferencích.^{21, 22}

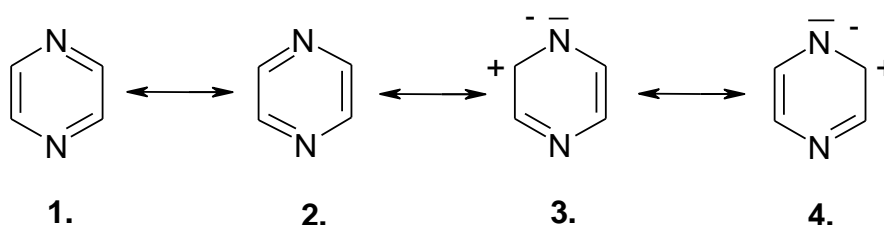
Mé úkoly byly následující:

1. Rešerše zaměřená na současný význam tuberkulózy ve světě, trendy v terapii a potenciální antituberkulotika.
2. V chemické literatuře vyhledat metody přípravy substituovaných amidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravit substituované amidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a dostupnými metodami ověřit strukturu připravených látek.
4. Předat připravené látky na testování (antimykobakteriální, antifungální, herbicidní).
5. Vypočítat lipofilitu ($\log P$) nově připravených látek.
6. Zhodnotit získaná data a pokusit se najít vztah mezi strukturou, lipofilitou a biologickým účinkem látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 PYRAZINOVÉ JÁDRO

Pyrazin, 1,4-diazin, je vysoce symetrickou molekulou. Pyrazinové jádro je planární útvar. Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů. Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base, která je v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem bází nejslabší. Pyrazinový kruh může být znázorněn jako rezonanční hybrid několika základních struktur (1.-4.).²³



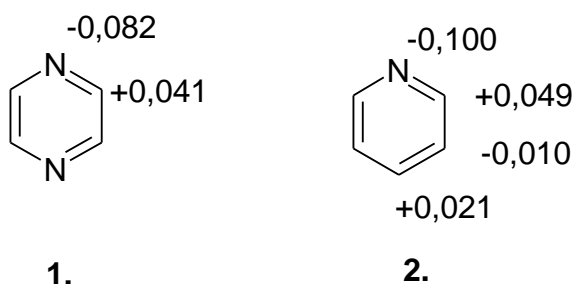
Tabulka č.1: Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly²⁴

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

Tabulka č.2: Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů²³

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. Vypočtené 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.^{25, 26, 27}



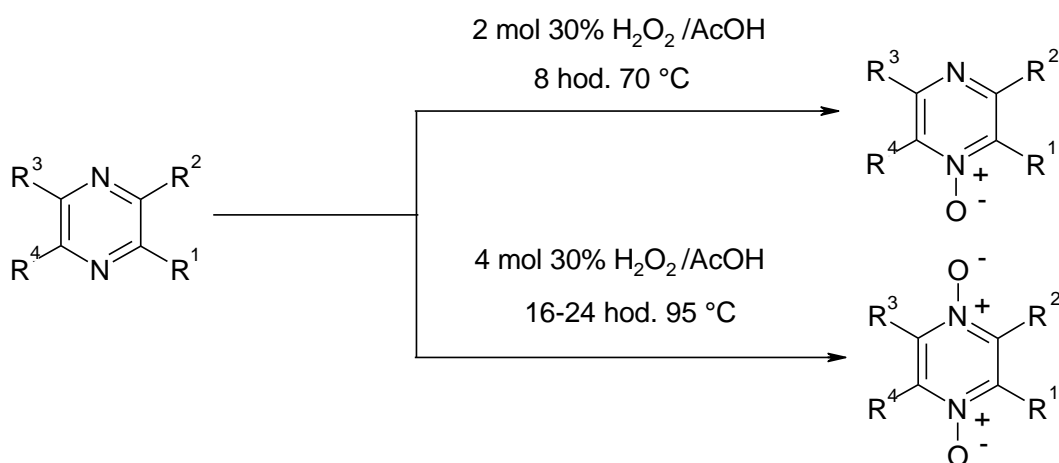
Meziatomové vzdálenosti jsou u pyrazinu a ostatních diazinů sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivňuje geometrii molekuly.²⁴

Pyrazin, stejně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím. Přímý elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Mnohem lépe však probíhají substituce nukleofilní, zvláště v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na N-oxid.²⁸

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 1500-1520 cm^{-1} slabou až střední intenzitu, v oblasti 1500-1465 a 1420-1370 cm^{-1} se nacházejí vibrace středně silné intenzity. Valenční vibrace N-oxidů se nachází v oblasti 1350-1260 cm^{-1} a mají silnou intenzitu. U monosubstituovaných pyrazinů se vyskytuje ještě silný pás v oblasti 1060-1040 a 1030-1010 cm^{-1} . Navíc mají pyrazinové deriváty ještě mimorovinné σ (C-H) vibrace kruhu v oblasti 860-800 cm^{-1} . U nesubstituovaného pyrazinu tato vibrace klesá pod 800 cm^{-1} . Substituenty se -M efektem posunují hodnoty vlnočtu vibrací k vyšším mezím, substituenty s +M efektem tyto hodnoty snižují.²⁹

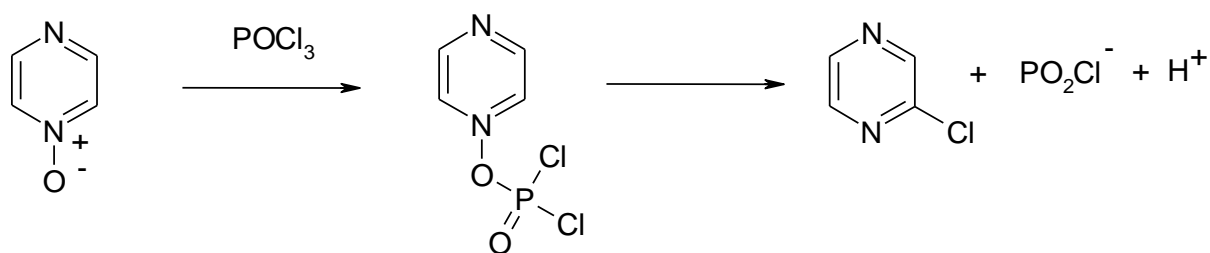
3.2 PŘÍPRAVA N-OXIDŮ PYRAZINU

Pyrazin, stejně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím. Důvodem toho je indukivní efekt dusíkatých atomů pyrazinu, který je příčinou kladného náboje na atom uhlíku heterocyklu, tím se ztěžuje přímý elektrofilní atak. Výhodnější jsou proto substituce nukleofilní, zejména pokud je pyrazinový kruh aktivován převedením na N-oxid. Aktivace na N-oxid se provádí nejčastěji pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, reakční teplotě a molární koncentraci oxidačního činidla probíhá do stadia pyrazin-1-oxidu či pyrazin-1,4-dioxidu.³⁰



3.3 HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA

Halogenpyraziny hrají v chemii derivátů pyrazinu velkou roli, jelikož mohou poskytovat díky snadné výměně atomu halogenu za nukleofil řadu derivátů pyrazinu jinak nedostupných. Existují tři klasické metody, jak lze halogenderiváty pyrazinu připravit. První způsob je založen na přímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi, druhý na záměně hydroxyly či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem pomocí chloridu nebo bromidu fosforylu. Nejčastěji se halogenderiváty pyrazinu získávají nukleofilní halogenací N-oxidu pyrazinu. Tato halogenace probíhá nejvíce do polohy 2, méně do polohy 3. Z halogenačních činidel se nejčastěji užívá chlorid fosforylu.³¹

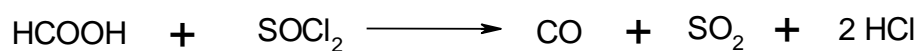


3.4 PŘÍPRAVA ACYLHALOGENIDŮ

Acyhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Ze všech acyhalogenidů mají největší význam acylchloridy. Acyhalogenidy se získávají reakcí kyselin s halogenidy fosforu a síry: chloridem fosforečným a fosforitým a chloridem thionylu (thionylchloridem). V některých případech je výhodné činidlo pro převádění kyselin na acylchloridy fosgen, popř. chlorid oxalové kyseliny a pro citlivé kyseliny benzoylchlorid.³²

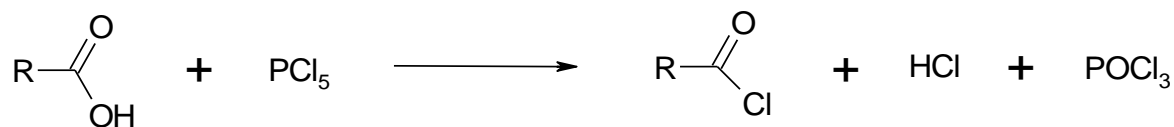
Výběr činidla se řídí tím, jak snadno lze izolovat produkt ze vzniklé směsi. Z tohoto pohledu je zřejmě nejvýhodnějším chlorid thionylu, který dává plynné vedlejší produkty, jež z reakční směsi unikají. Často se ale musí při přípravě acylchloridů používat chloridu thionylu v přebytku. Po skončení reakce se reakční směs zpravidla zpracovává destilací. Chlorid thionylu však vře již při teplotě 76°C, proto se hodí tento, jinak velice snadný, způsob pro přípravu chloridů s vyšším bodem varu.³²

Pokud není možné přebytek chloridu thionylu oddestilovat vzhledem k blízkým teplotám varu chloridu thionylu a vzniklého acylhalogenidu, odstraní se jeho přebytek přidávkem kyseliny mravenčí.³²

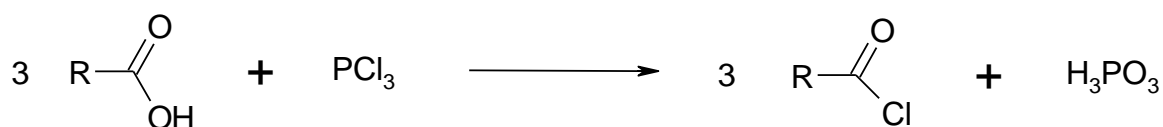


Acylchloridy se připravují z karboxylových kyselin působením: ³²

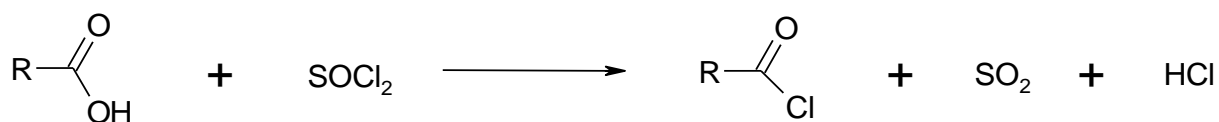
- chloridu fosforečného



- chloridu fosforitého



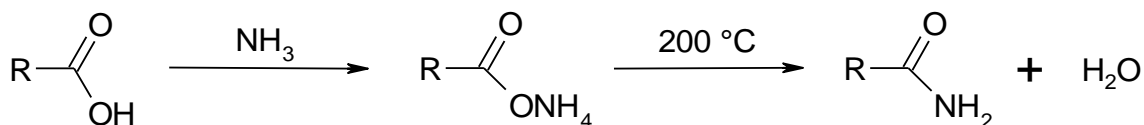
- chloridu thionylu



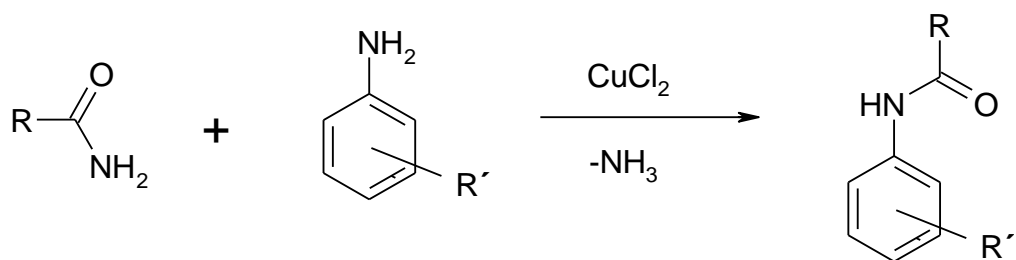
3.5 PŘÍPRAVA ANILIDŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN

Anilidy či amidy karboxylových kyselin lze připravit z kyselin nebo i z většiny jejich funkčních derivátů. ³²

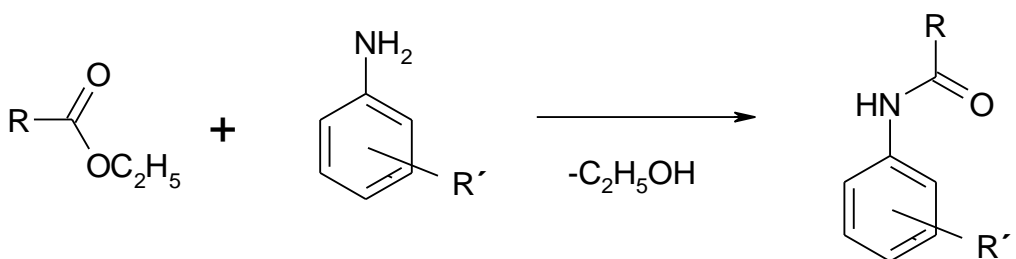
Z kyselin se amidy získávají aminolýzou karboxylových kyselin. Po převedení kyseliny na sůl s amoniakem nebo primárním či sekundárním aminem, ji podrobíme tepelnému rozkladu. Takto získáme primární, sekundární nebo terciární amidy. Pro přípravu anilidů má tato metoda menší význam. ³²



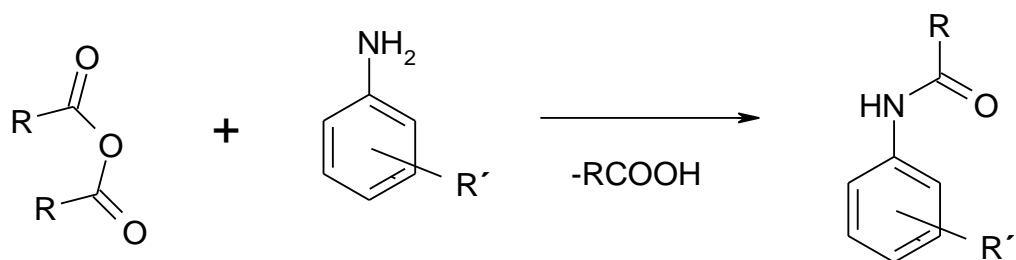
Další možností, jak získat amidy resp. anilidy karboxylových kyselin je aminolýza amidů karboxylových kyselin.



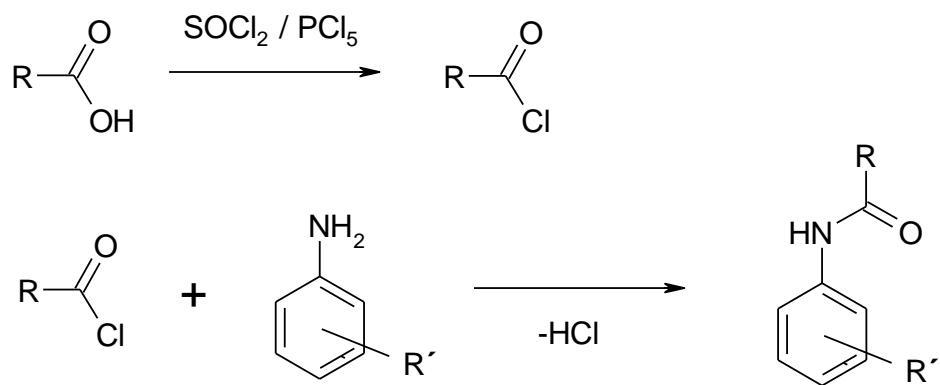
Můžeme také využít aminolýzu esterů karboxylových kyselin.



Další možností je i aminolýza anhydridů karboxylových kyselin.



Avšak nejvýhodnější metodou přípravy anilidů karboxylových kyselin je aminolýza chloridu karboxylové kyseliny. Pro vázání uvolněné kyseliny chlorovodíkové se přidává bezvodý pyridin. Reakce probíhá za laboratorní teploty, tím je vyloučena substituce druhého vodíku acylem.³²



Reakce acylchloridů a anhydridů s amoniakem a amíny probíhá většinou provádějí za laboratorní teploty, ale estery reagují za této teploty pouze s amoniakem. Při použití acylchloridů k přípravě amidů vzniká chlorovodík, resp. karboxylová kyselina při použití anhydridů, který vyžaduje molekulu baze ke své neutralizaci.³²

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE

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

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány tenkovrstvou chromatografií 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.

Všechny analyzované látky byly čištěny krystalizací s aktivním uhlím (voda, ethanol).

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

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

Chromatografické stanovení log K (K – kapacitní faktor) pomocí HPLC provedl PharmDr. Josef Jampílek, Ph.D. v laboratořích firmy ZENTIVA a.s. Praha.

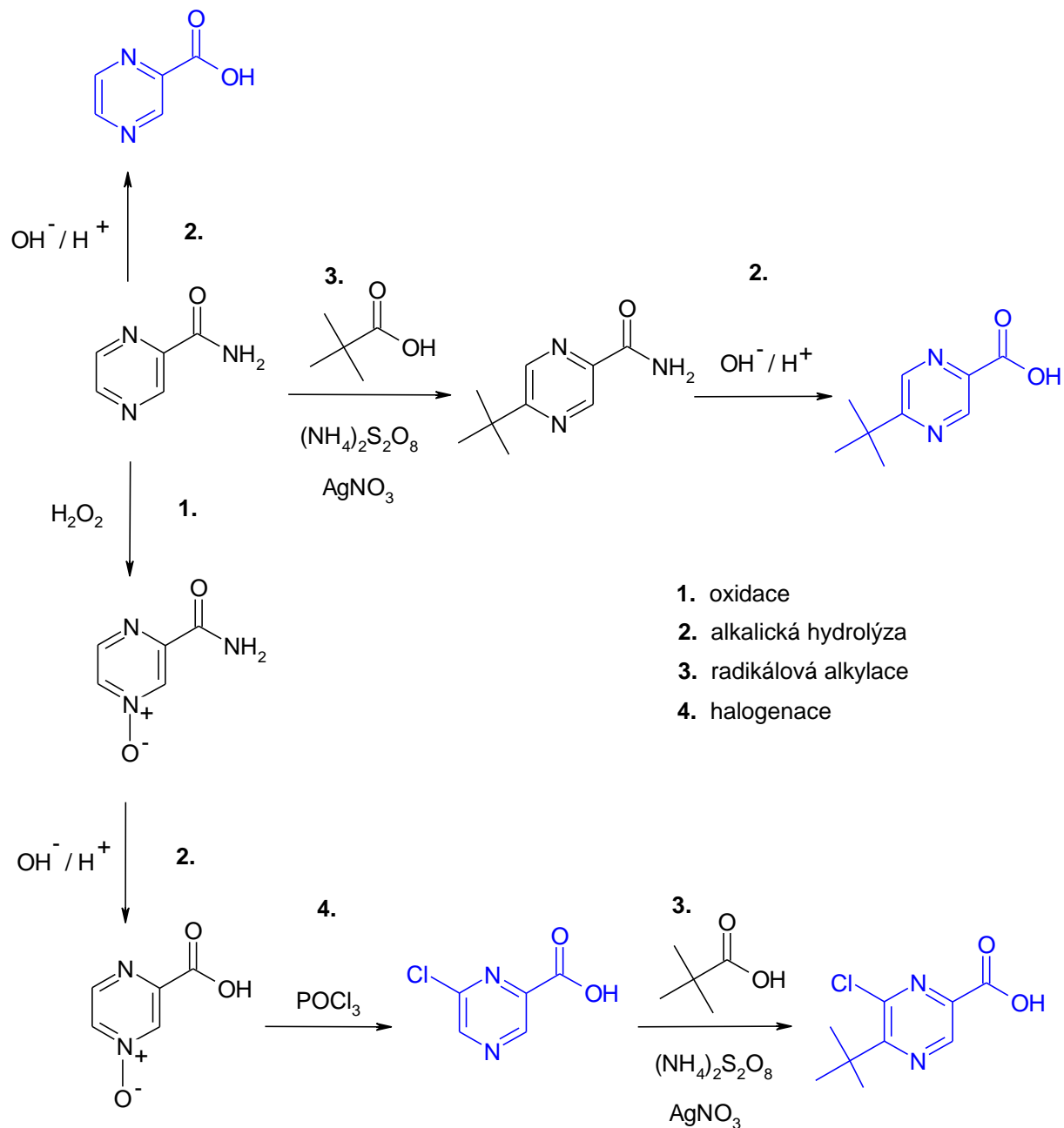
Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano) byla provedena na KFCHKL FaF UK HK paní Hronovou.

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

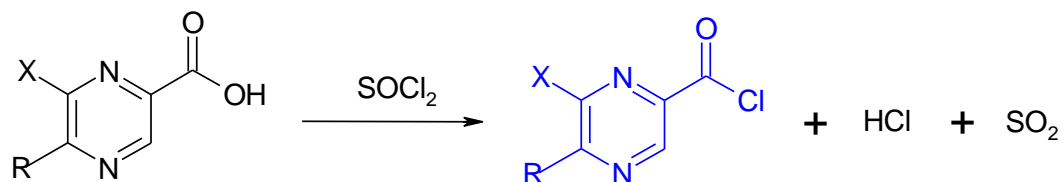
^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkury – Vx BB 300 (299,95 MHz – ^1H and 75,43 MHz – ^{13}C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl a spektra vyhodnotil doc.PharmDr. J. Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK HK. Chemické posuny jsou vztaženy k $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$.

4.2 SCHEMA PROVÁDĚNÝCH REAKCÍ

4.2.1 SYNTÉZA VÝCHOZÍCH SUBSTITUOVANÝCH PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN



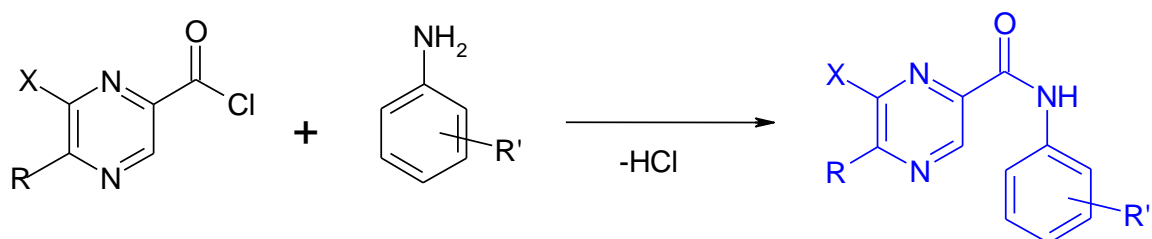
4.2.2 SYNTÉZA CHLORIDŮ SUBSTITUOVANÝCH PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN



R = H, terc-butyl

X = H, Cl

4.2.3 SYNTÉZA ANILIDŮ SUBSTITUOVANÝCH PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN



R = H, terc-butyl

R' = 2-Br, 2,4-F, 2-CH₃-4-F-5-Br, 3-N(CH₃)₂

X = H, Cl

4.3 OBECNÝ POSTUP PŘÍPRAVY

4.3.1 PŘÍPRAVA CHLORIDŮ SUBSTITUOVANÝCH PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN

0,005 mol substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustí ve 20 ml bezvodého toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka je opatřena zpětným chladičem s chlorkalciovým uzávěrem. K roztoku se přidá 0,05 mol (5,5 g) thionylchloridu a reakční směs se zahřívá pod zpětným chladičem 1,5 hodiny při teplotě 110 °C. Poté se nezreagovaný thionylchlorid oddestiluje za sníženého tlaku na vakuové odparce. Na závěr se přidá malé množství bezvodého toluenu pro azeotropní oddestilování zbytku thionylchloridu z produktu. Surový produkt v baňce se dále nečistí a použije se do další reakce.

4.3.2 PŘÍPRAVA ANILIDŮ SUBSTITUOVANÝCH PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN

0,0017 mol substituovaného anilinu se rozpustí v 10 ml bezvodého acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku se přidá 0,0017 mol (0,14 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchačce je po kapkách přidáván roztok 0,0017 mol chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém acetonu. Směs se míchá asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Potom se aceton oddestiluje za sníženého tlaku na vakuové odparce. Surový produkt se čistí krystalizací ze směsi voda:ethanol. Následně se provede kontrola průběhu reakce pomocí TLC za použití vyvíjecí soustavy toluen:aceton (1:1). Na závěr se změří teplota tání získaného produktu.

4.4 PRINCIPY BIOLOGICKÉHO HODNOCENÍ

4.4.1 ANTITUBERKULOTICKÁ AKTIVITA

Připravené látky byly podrobeny testování na antituberkulotickou účinnost. Smlouva podepsaná 27. června 1996 mezi Univerzitou Karlovou v Praze, Farmaceutickou fakultou v Hradci Králové a americkou institucí Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), jež je součástí National Institute of Health (NIH), umožňuje pracovištěm fakulty zapojení do mezinárodního programu vyhledávání antituberkulotické aktivity u nově připravených sloučenin (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility, TAACF).

Program TAACF se skládá ze tří úzce propojených částí:

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

Southern Research Institute, tj. institut přímo řízený NIAID, je pověřen koordinací celého programu.

Primární *in vitro* screening látek je prováděn při koncentraci 12,5 µg/ml proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv v mediu BACTEC 12B za použití radiometrického systému BACTEC 460.

Látky, u kterých je v primárním screeningu nalezena vyšší než 90% inhibice, jsou zařazeny do další fáze testování při nižších koncentracích proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv za účelem určení skutečné MIC v mikrodilučním Almar Blue testu (MABA). Zároveň jsou látky zkoušeny proti *Mycobacterium avium*. V případě zjištění dostatečné aktivity následuje testování cytotoxicity a dále experimenty na laboratorních zvířatech.³³

4.4.2 ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na antimykotickou aktivitu na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové doc. RNDr. Vladimírem Buchtou, CSc. se spolupracovníky.

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640, který byl pufovaný na pH 7 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (3-(morfolino)-propansulfonová kyselina). Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975 μM . Součástí testování byly jednak slepé pokusy (bez účinné látky), jednak určení aktivity standardu (ketokonazol) vůči jednotlivým kmenům. MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách inkubace. Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti *Candida albicans* ATCC 44859 (CA), *C. tropicalis* 156 (CT), *C. krusei* E28 (CK), *C. glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigelii* 1188 (TB), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF) a *Absidia corymbifera* 272 (AC).^{33,34}

4.4.3 HERBICIDNÍ AKTIVITA

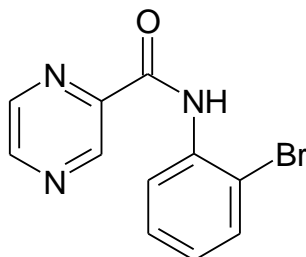
Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na herbicidní aktivitu v Chemickém ústavu Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě RNDr. Katarínou Kráľovou, CSc. Jednalo se o testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris* a o testy na inhibici přenosu elektronů v chloroplastech špenátu.

Chlorella vulgaris algae byla stacionárně kultivována (7 dní, a to 16 hodin světlo/ 8 hodin tma) podle popsané metodiky. Chlorofyl obsažený v suspenzi z řas byl stanoven spektrofotometricky (Specord UV VIS, Zeiss Jena, Germany) po extrakci *N,N*-dimethylformamidem. Antialgální aktivita (inhibice tvorby chlorofylu) byla u zkoumaných látek měřena v dimethylsulfoxidu v koncentraci $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/l v přítomnosti DCPIP (2,6-dichlorfenolindofenolu) jako akceptoru elektronů. Součástí testování bylo určení aktivity standardu DCMU (3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea).³³

5 VÝSLEDKY RIGORÓZNÍ PRÁCE

5.1 NOVĚ PŘIPRAVENÉ LÁTKY A JEJICH ANALYTICKÁ DATA

1. 2-bromanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: bílá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{11}H_8BrN_3O$

Mh: 278,11

Množství: 107,8 mg

Výtěžek: 22,80 %

Čistota: 99,72 %

Teplota tání: 140,0 °C

Rf: 0,85

Elementární analýza: *vypočteno*: C 47,51 % H 2,90 % Br 28,73 % N 15,11 %

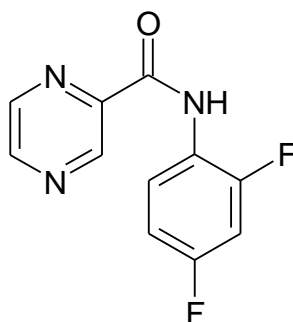
naměřeno: C 47,80 % H 2,95 % N 14,78 %

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3320 (NH), 1693 (CO), 1589 (fenyl), 1541 (NH), 1304, 1172, 1131, 1021 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.35 (1H, bs, NH), 9.51 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.83 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 8.65 (1H, dd, $J=2.5$ Hz, $J=1.5$ Hz, H5), 7.61 (1H, dd, $J=7.9$ Hz, $J=1.5$ Hz, H6'), 7.60 (1H, dd, $J=7.9$ Hz, $J=1.5$ Hz, H3'), 7.43-7.35 (1H, m, H5'), 7.04 (1H, dt, $J=7.9$ Hz, $J=1.5$ Hz, H4')

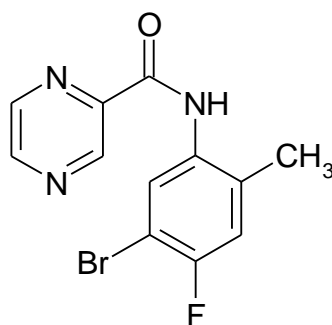
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 160.8, 147.7, 144.6, 144.3, 142.7, 135.3, 132.5, 128.5, 125.6, 121.5, 113.9

2. 2,4-difluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis:	šedobílá krystalická látka
Sumární vzorec:	$C_{11}H_7F_2N_3O$
Mh:	235,19
Množství:	58,0 mg
Výtěžek:	14,51 %
Čistota:	99,75 %
Teplota tání:	123,5 °C
Rf:	0,83
Elementární analýza:	<i>vypočteno:</i> C 56.18 % H 3.00 % F 16.16 % N 17.87 % <i>naměřeno:</i> C 56,06 % H 3,09% N 17,61%
IČ spektrum (KBr), cm^{-1} :	3350 (NH), 1698 (CO), 1610 (fenyl), 1539 (NH), 1288, 1145, 1091 (pyrazin)
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$)	δ 9.87 (1H, bs, NH), 9.50 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H3), 8.84 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 8.63 (1H, dd, $J=2.5$ Hz, $J=1.4$ Hz, H5), 8.58-8.45 (1H, m, H3'), 7.02-6.88 (2H, m, H5', H6')
^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$)	δ 160.7, 158.9 (q, $J=247.1$, Hz, $J=11.8$ Hz), 152.8 (q, $J=247.7$ Hz, $J=11.8$ Hz), 147.8, 144.6, 144.0, 142.6, 122.3 (q, $J=9.2$ Hz, $J=2.3$ Hz), 111.4 (d, $J=21.7$ Hz, $J=3.7$ Hz), 103.8 (q, $J=26.6$ Hz, $J=22.9$ Hz)

3. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle stříbrnošedá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{12}H_9BrFN_3O$

Mh: 310,13

Množství: 124,8 mg

Výtěžek: 23,67 %

Čistota: 99,26 %

Teplota tání: 164,0 °C

Rf: 0,76

Elementární analýza: *vypočteno*: C 46,48 % H 2,93 % Br 25,76 % F 6,13 % N 13,55 %

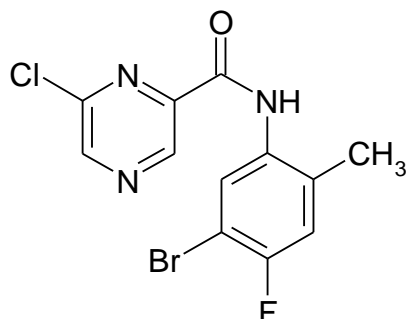
naměřeno: C 46,22 % H 2,06 % N 13,61 %

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3356 (NH), 3109 (methyl), 1698 (CO), 1589 (fenyl), 1541 (NH), 1397, 1199, 1117, 1020 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.61 (1H, bs, NH), 9.49 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H3), 8.83 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 8.60 (1H, dd, $J=2.5$ Hz, $J=1.4$ Hz, H5), 8.46 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H6'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3'), 2.35 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 160.5, 155.9 (d, $J=245.1$ Hz), 147.8, 144.7, 144.1, 142.5, 132.1 (d, $J=3.4$ Hz), 129.8 (d, $J=6.9$ Hz), 126. 2, 117.8 (d, $J=23.5$ Hz), 106.2 (d, $J=21.7$), 17.5

4. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle oranžová krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{12}H_8BrClFN_3O$

Mh: 344,57

Množství: 105,5 mg

Výtěžek: 18,01 %

Čistota: 99,31 %

Teplota tání: 170,5 °C

Rf: 0,92

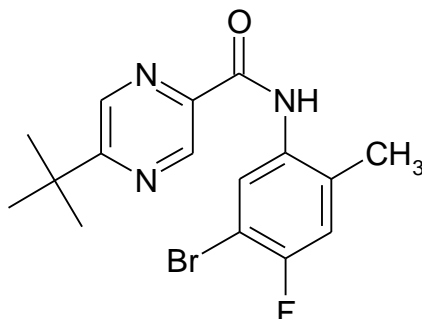
Elementární analýza: *vypočteno*: C 41,83% H 2,34% Br 23,19% Cl 10,29% F 5,51% N 12,19%
naměřeno: C 41,81% H 1,90% N 12,08%

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3357 (NH), 3044 (methyl), 1693 (CO), 1591 (fenyl), 1532 (NH), 1399, 1201, 1168, 1111, 1010 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.38 (1H, s, H3), 9.33 (1H, bs, NH), 8.84 (1H, s, H5), 8.35 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H6'), 7.02 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3'), 2.33 (3H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 159.4, 156.3 (d, $J=246.2$ Hz), 147.9, 147.5, 143.6, 142.2, 131.7 (d, $J=3.2$ Hz), 130.5 (d, $J=7.2$ Hz), 126.8, 117.9 (d, $J=23.5$ Hz), 106.3 (d, $J=21.7$), 17.5

5. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: bílá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{16}H_{17}BrFN_3O$

Mh: 366,24

Množství: 291,5 mg

Výtěžek: 46,82 %

Čistota: 99,95 %

Teplota tání: 164,0 °C

Rf: 0,92

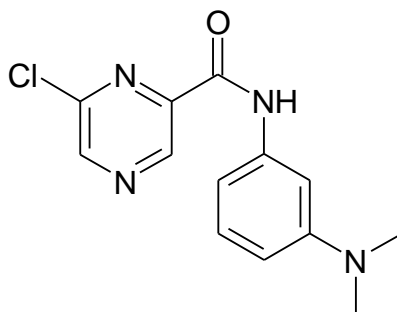
Elementární analýza: *vypočteno*: C 52,47 % H 4,68 % Br 21,82 % F 5,19 % N 11,47 %
naměřeno: C 51,69% H 3,53% N 11,43%

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3348 (NH), 2963, 2906, 2868 (*terc.*-butyl, methyl), 1697 (CO), 1590 (fenyl), 1538 (NH), 1398, 1200, 1141, 1030 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.61 (1H, bs, NH), 9.38 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H3), 8.64 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H6), 8.49 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H6'), 6.99 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3'), 2.34 (3H, s, CH_3), 1.45 (9H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.1, 161.0, 155.8 (d, $J=245.1$ Hz), 143.0, 141.1, 139.2, 132.4 (d, $J=3.2$ Hz), 129.5 (d, $J=6.9$ Hz), 126. 1, 117.8 (d, $J=23.5$ Hz), 106.2 (d, $J=21.5$), 37.1, 29.7, 17.5

6. 3-dimethylaminoanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: oranžovožlutá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{13}H_{13}ClN_4O$

Mh: 276,73

Množství: 41,4 mg

Výtěžek: 8,80 %

Čistota: 97,21 %

Teplota tání: 122,7 °C

Rf: 0,80

Elementární analýza: *vypočteno*: C 56.43 % H 4.74 % Cl 12.81 % N 20.25 %

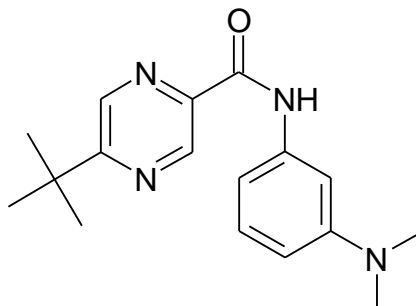
naměřeno: C 56,81 % H 4,98 % N 20,41 %

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : výsledky nejsou k dispozici

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) výsledky nejsou k dispozici

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) výsledky nejsou k dispozici

7. 3-dimethylaminoanilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: žlutobílá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{17}H_{22}N_4O$

Mh: 298,39

Množství: 108,1 mg

Výtěžek: 21,31 %

Čistota: 99,17 %

Teplota tání: 90,2 °C

Rf: 0,72

Elementární analýza: *vypočteno*: C 68,43 % H 7,43 % N 18,78 % O 5,36 %

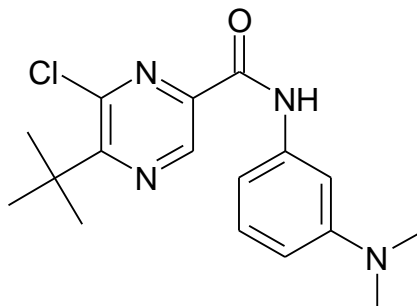
naměřeno: C 68,76 % H 7,86 % N 17,42 %

IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3343 (NH), 3097, 3019 (dimethylamino), 2960, 2935, 2904, 2806 (*terc.*-butyl) 1682 (CO), 1588 (fenyl), 1537 (NH), 1358, 1304, 1140, 1033 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.61 (1H, bs, NH), 9.39 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H3), 8.62 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H6), 7.45-7.36 (1H, m, H2'), 7.28-7.20 (1H, m, H5'), 7.03-6.93 (1H, m, H6'), 6.64-6.53 (1H, m, H4'), 3.00 (6H, s, CH_3), 1.45 (9H, s, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) výsledky nejsou k dispozici

8. 3-dimethylaminoanilid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



Popis: světle žlutohnědá krystalická látka

Sumární vzorec: $C_{17}H_{21}ClN_4O$

Mh: 332,84

Množství: 49,6 mg

Výtěžek: 8,76 %

Čistota: 98,23 %

Teplota tání: 117,0 °C

Rf: 0,79

Elementární analýza: vypočteno: C 61,35 % H 6,36 % Cl 10,65 % N 16,83 %

naměřeno: C 62,20 % H 6,85 % N 15,68 %

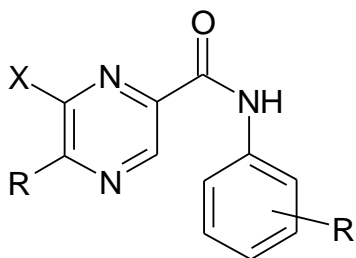
IČ spektrum (KBr), cm^{-1} : 3377 (NH), 3097, 3019 (dimethylamino), 2983, 2933, 2806 (*terc*-butyl) 1700 (CO), 1609 (fenyl), 1550 (NH), 1422, 1314, 1259, 1148, 1060 (pyrazin)

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) výsledky nejsou k dispozici

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) výsledky nejsou k dispozici

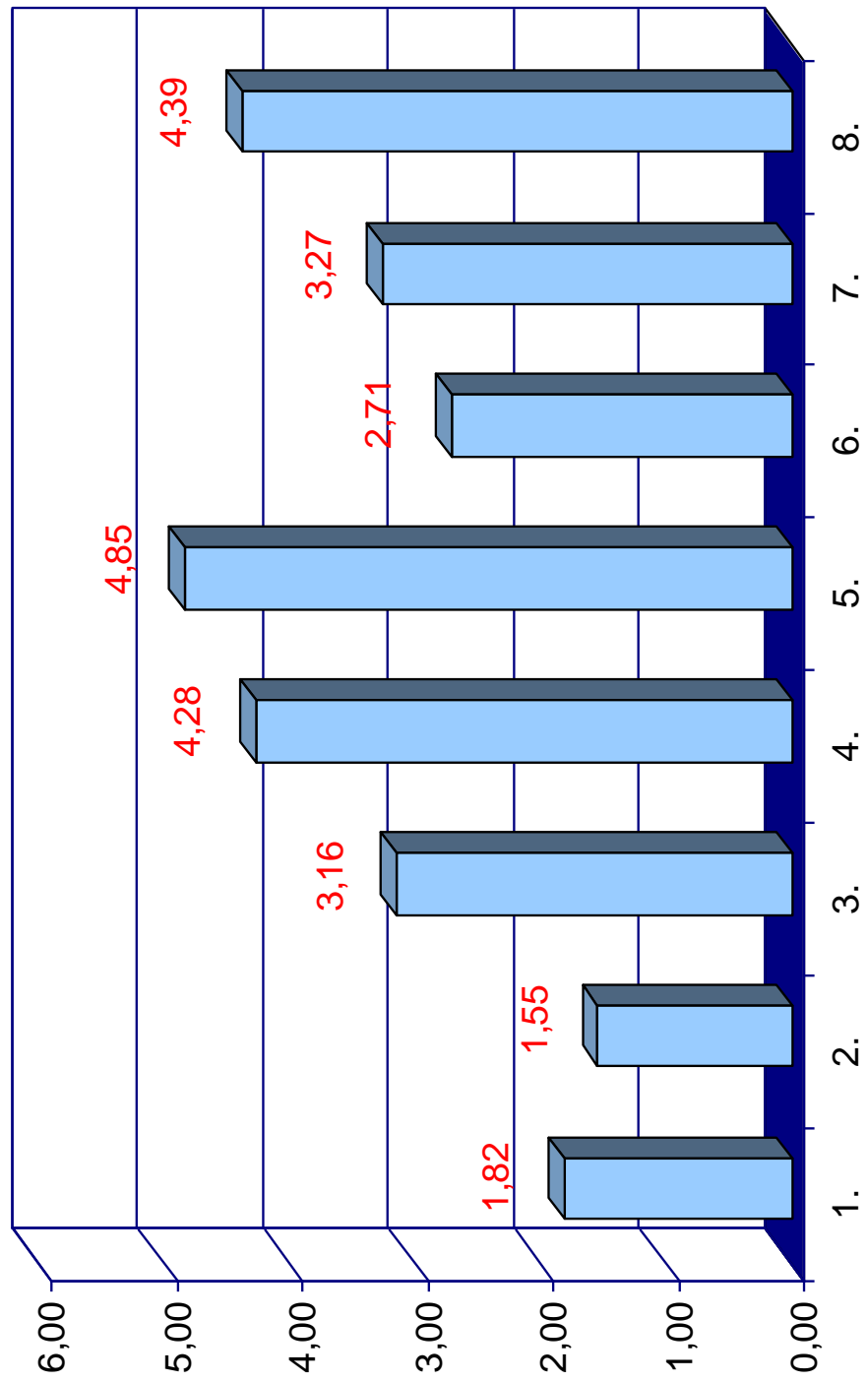
5.2 LIPOFILITA PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

Tabulka č. 3: Chromatograficky stanovená hodnota Log K (K-kapacitní faktor) a vypočítaná hodnota Log P (ACD/logP ver. 1.0)



Látka č.	Struktura			Log K	Log P
	-X	-R	-R'		
1.	H	H	2-Br	0,7186	1,82
2.	H	H	2,4-F	0,4719	1,55
3.	H	H	2-CH ₃ -4-F-5-Br	0,7271	3,16
4.	Cl	H	2-CH ₃ -4-F-5-Br	1,0674	4,28
5.	H	(CH ₃) ₃ C	2-CH ₃ -4-F-5-Br	1,4113	4,85
6.	Cl	H	3-N(CH ₃) ₂	0,7721	2,71
7.	H	(CH ₃) ₃ C	3-N(CH ₃) ₂	1,0398	3,27
8.	Cl	(CH ₃) ₃ C	3-N(CH ₃) ₂	1,3398	4,39

Graf č. 4: Lipofilita (Log P) připravených látek



5.3 VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTITUBERKULOTICKÉ AKTIVITY

Všech 8 připravených látek bylo v červnu 2006 odesláno na testování antimykobakteriální aktivity do TAACF. Výsledky testů zatím nejsou k dispozici.

5.4 VÝSLEDKY HODNOCENÍ ANTIMYKOTICKÉ AKTIVITY

Tabulka č.4: Hodnoty antimykotické aktivity připravených látek ve srovnání s účinností ketokonazolu (KET). Tučně je vyznačena MIC, která se nachází v rámci testovaného rozmezí.

Kmen (kód)		LátkaČ. - MIC ($\mu\text{mol/l}$)								
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	KET
CA	24h	>125	500	>125	62.5	>125	62.5	62.5	>500	<0.24
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	<0.24
CT	24h	>125	500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	1.95
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	3.91
CK	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	0.98
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	1.95
CG	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	0.49
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	1.95
TB	24h	>125	500	>125	>125	>125	62.5	>500	>500	<0.24
	48h	>125	500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	<0.24
AF	24h	125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	7.81
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	7.81
AC	24h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	31.25
	48h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	>500	>500	31.25
TM	72h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	125	>500	0.98
	120h	>125	>500	>125	>125	>125	>500	500	>500	1.95

5.5 VÝSLEDKY HODNOCENÍ HERBICIDNÍ AKTIVITY

Tabulka č.5: Hodnoty herbicidní aktivity pro sérii připravených látek ve srovnání s účinností DCMU.

Látka č.	Redukce obsahu chlorofylu (<i>Chlorella vulgaris</i>)	
	log (1/ IC ₅₀) [mol /dm ³]	IC ₅₀ [mmol/dm ³]
1.	x	x
2.	3,2840	0,520
3.	x	x
4.	a	a
5.	b	b
6.	3,3843	0,413
7.	3,8894	0,129
8.	4,5659	0,027
DCMU		0,0073

Poznámka: x – neúčinné látky, a – látka se vysrážela v průběhu testování,
b – vzorek se odbarvuje

6 DISKUZE

Úvod je věnován problematice onemocnění tuberkulózou v současnosti. Jsou zde informace týkající se zejména etiologie a epidemiologie tohoto onemocnění, zaměřené zejména na situaci v České republice. V neposlední řadě jsou zde také informace o současnosti a vývojových trendech v oblasti terapie tuberkulózy.

Teoretická a experimentální část se zabývá charakteristikou pyrazinového jádra, jeho reaktivitou, možnými způsoby přípravy anilidů karboxylových kyselin a metodikou biologického hodnocení.

V praktické části jsem se zaměřil na syntézu látek ze skupiny anilidů různě substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny. V minulosti bylo na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv připraveno několik sérií látek tohoto typu.

Série 8 látek byla připravena reakcí chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny s příslušnými anilíny. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

1. Příprava chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém toluenu.
2. Vlastní syntéza amidu příslušné kyseliny aminolýzou.

Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 8,76 % – 46,82 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu a ztrátách vzniklých při přečišťování produktu. Totožnost a čistota jednotlivých látek byly kontrolovány TLC chromatografií, teplotou tání, elementární analýzou, IČ spektry, ^1H a ^{13}C NMR. Čištění látek jsem prováděl rekrystalizací ze směsi ethanol/voda.

Lipofilita ($\text{Log } P$) připravených látek se pohybovala v rozmezí 1,55 – 4,85. Nejnižší lipofilitu vykazala látka č. 2 a nejvyšší látka č. 5. Zjištěná lipofilita prokázala, že látky se substituovaným pyrazinovým jádrem mají vyšší lipofilitu než látka bez substituce pyrazinu, přičemž jako lipofilnější se ukázala substituce *tert*-butylem než substituce chlorem. Z hlediska substituce anilinu, nejnižší lipofilitu vykazaly látky se substituenty 2-Br a 2,4-F a nejvyšší látky se substituenty 2- CH_3 -4-F-5-Br a 3- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, přičemž látky substituované 2- CH_3 -4-F-5-Br byly lipofilnější (viz graf č. 4).

Všech 8 připravených látek bylo v červnu 2006 odesláno na testování antituberkulotické aktivity do TAACF. Výsledky testů zatím nejsou k dispozici.

Látky byly podrobeny také testům na antimykotickou aktivitu. Nejvyšší antimykotickou aktivitu *in vitro* vykazovala látka č. **6**, a to proti kmenům *Candida albicans* a *Trichosporon beigelii*, a látky č. **4** a **7** proti kmenu *Candida albicans*. Aktivitu prokázaly i látky č. **1**, **2**. Ve srovnání se standardem (ketokonazol) jsou však všechny tyto aktivity velmi slabé.

Zajímavějších výsledků bylo dosaženo v testování látek na redukci chlorofylu u *Chlorella vulgaris*, kde největší aktivity dosáhla látka č. **8**, která se svou účinností přiblížila standardu DCMU.

7 ZÁVĚR

V rámci své rigorózní práce jsem připravil 8 dosud v chemické literatuře nepopsaných sloučenin:

1. 2-bromanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
2. 2,4-difluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
3. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
4. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
5. 5-brom-4-fluor-1-methylanilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
6. 3-dimethylaminoanilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
7. 3-dimethylaminoanilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
8. 3-dimethylaminoanilid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny

Všechny uvedené látky jsou charakterizovány elementární analýzou, teplotou tání a lipofilitou. Také jsou zde uvedena IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektra těchto látek, kromě látky č. 6. a některých dat u látek č. 7. a 8., u kterých nejsou zatím výsledky k dispozici.

Připravené látky byly podrobeny *in vitro* biologickému hodnocení. Jednalo se o testy antimykotické a herbicidní aktivity. Výsledky testů antituberkulotické aktivity nejsou zatím k dispozici.

8 LITERATURA

- ¹ Krákorová G., Šafránek J., Chudáček Z., Daum O., Lékařské listy 4, ZDN 24. 2. 2006, Mladá fronta, Praha 2006, s. 21-23
- ² http://www.who.int/tb/publications/2006/tb_factsheet_2006_1_en.pdf (6. 11. 2006)
- ³ Peřinová J.: Tuberkulóza, Solutio 2000/2001, Medon, Praha 2000, s. 65-70
- ⁴ http://www.eurotb.org/country_profiles/czech.pdf (7. 11. 2006)
- ⁵ Buchta V., Jílek P., Horáček J., Horák V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998, s. 113
- ⁶ http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_02.jpg (7. 11. 2006)
- ⁷ <http://nobelprize.org/medicine/educational/tuberculosis/readmore.html> (7. 11. 2006)
- ⁸ <http://ist-socrates.berkeley.edu/~jmp/TB1.htm> (7. 11. 2006)
- ⁹ Tripathi R.P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V.K.: Med. Res. Rev. 25, s.93-131 (2005)
- ¹⁰ Mitchison, D. A.: Tuberkule, **66**, 1985, s. 219
- ¹¹ <http://sph.berkeley.edu:7133/research/highlights/03Dec08-1.htm> (14. 11. 2006)
- ¹² Bureš J., Horáček J.: Základy vnitřního lékařství, Galén, Praha 2003, s. 78-84
- ¹³ Walker R., Edwards C.: Clinical Pharmacy and Therapeutics, third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh 2003, s. 590-591
- ¹⁴ The Merck Index (an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals), 13th Edition, Merck Co., Inc., 2001
- ¹⁵ Katzung B.G.: Základní a klinická farmakologie, H&H, Praha 1994, s. 685-693
- ¹⁶ Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P.: Farmaceutická chemie IV., Karolinum, Praha 2006, s. 119-124
- ¹⁷ Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: Pharmacology, fifth edition, Churchill Livingstone, Edinburgh 2003, s. 649-653
- ¹⁸ Doležal M., Miletín M., Kuneš J., Kráľová K.: Molecules, 7 , 2002, s. 363-373

-
- ¹⁹ Bruner R.: Syntéza substituovaných karboxamidů pomocí radikálové amidace. Studentská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 15. duben 2005
- ²⁰ Bruner R.: Diplomová práce, Hradec Králové, KFCHKL FaF, 2006
- ²¹ Doležal M., Bruner R., Buchta V., Králová K.: Carboxamide bridging ligand in series of pyrazinamide analogues, their synthesis and biological evaluation. 11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, 28.sprna-1.září 2005, Brno, Česká republika
- ²² Doležal M., Bruner R., Buchta V., Jampílek J., Králová K.: Amidy pyrazinkarboxylové kyseliny: syntéza antifungální hodnocení a jejich inhibiční vliv na fotosyntézu. 57. Sjezd chemických společností, 4.-8. září 2005, Tatranské Matliare, Slovenská republika
- ²³ Pratt Y.T.: Pyrazines and Pyperazines, In: ELDERFIELD R.C.: Heterocyclic Compounds, 6, J Willey and Sons, Inc. (1957)
- ²⁴ Požarskij A.F.: Theoretical principles of the chemistry of heterocycles, Chim. Geterocicl. Sojedin. 7, s. 867-905 (1985)
- ²⁵ Katritzki A.R., Boulton A.J.: Advances in Heterocyclic Chemistry, 14, Academic Press, New York and London (1972)
- ²⁶ Black P.J., McDowell C.A.: Spin densities of polyasine anions, Mol. Phys. 12, 233 (1967), In: Chem. Abstr. 67, 77716f (1967)
- ²⁷ Kwiatowski S., Zurawski B.: Indexes of the chemical reactivity of nitrogen heterobenzenes. Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Math. Astron. Phys. 13, 489 (1965), In: Chem. Abstr. 64, 15719 (1966)
- ²⁸ Klein B., Hetman N.E., O'Donnell M.E.: Pyrazines III. The action of phosphoryl chloride on pyrazine N- oxides, J. Org. Chem. 28, 1682 (1960)
- ²⁹ Shindo H.: Infrared spectra of heterocyclic compounds.VII. Infrared spectra of substituted pyrazines and their N-oxid. Chem. Pharm. Bull. 8, 34 (1960)
- ³⁰ Klein B., Hetman N. E., O'Donnell M. E.: J. Org. Chem. 28, s. 1682 (1963)
- ³¹ Sato N., Fuji M.: J.Heterocycl.Chem.,31, 1994, s. 1177
- ³² Červinka O. a kol.: Chemie organických sloučenin, 1. vydání, 2. díl, SNTL, Praha, 1987, s. 49-50, 73-76
- ³³ Doležal M., Vičík R., Miletín M., Králová K.: Chem. Pap., 54, s. 254 (2000)

³⁴ Doležal M., Palek L., Vinšová J., Buchta V., Jampílek J., Králová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides; Synthesis and Their Biological Evaluation. *Molecules* 11 (4), 242-256 (2006)