

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Deriváty pyrazinu jako potenciální
antituberkulóza

Rigorózní práce

2010

Mgr. Michal Kašírek

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

estné prohlášení:

Prohlašuji na svou est, že tato práce je mým p vodním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatn . Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem p i zpracování erpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou ádn citovány.

V Hradci Králové

.....

podpis

Abstrakt

Název rigorózní práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální antituberkulotika

V rámci této rigorózní práce byla provedena rešerše zaměřená na současný výskyt tuberkulózy ve světě, na možnosti současné terapie, ale i na nové trendy v terapii. Vlastní práce spočívala v syntéze dosud v literatuře nepopsaných sloučenin. Výchozí látkou byl 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril. Látky vznikly aminodehalogenací reakcí, navázáním alkylových zřetězení přes *-NH-* skupinu, přičemž jejich postranní zřetězení se analogicky rozšiřovaly. Dá se říci, že produkt byl připraven reakcí 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s příslušným primárním alifatickým aminem. Finální látky byly charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, ^1H a ^{13}C NMR a IR spektry. Všechny látky byly podrobeny *in vitro* testování na jejich biologickou aktivitu. Jednalo se o antimykobakteriální, antimykotickou a antibakteriální testování. Ve skupině antituberkulotického testování vzrůstala aktivita od nejméně k nejvíce lipofilní sloučenině.

Abstract

Title of rigorous thesis: Pyrazine derivatives as potential antituberculous drugs

In this rigorous thesis the recherche was realized which was focused on recent incidence of tuberculosis in the world, the possibility of present therapy and the new trends in therapy as well. This thesis dealt with synthesis of undocumented compounds in literature. The starting compound was 5-chloro-6-methylpyrazine-2,3-dicabronitrile. The compounds were developed by aminodehalogenational reaction, linked to alkyl descriptor across *amino* group, whereas side chains were analogously extended. It can be said that the product was developed by reaction of 5-chloro-6-methylpyrazine-2,3-dicabronitrile with corresponding primary aliphatic amine. Final compounds were characterized by thaw point, TLC, elementary analysis, ^1H a ^{13}C NMR and IR. All compounds were liable *in vitro* testing on their biological activity – antimycobacterial, antifungal and antibacterial. In the group of antituberculosis testing the activity grew up from the least to the most lipophilicity compound.

Obsah:

ESTNÉ PROHLÁŠENÍ	- 2 -
ABSTRAKT	- 3 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATK	- 5 -
CÍL PRÁCE	- 6 -
1. TEORETICKÁ ČÁST	- 7 -
1.1. PYRAZIN	- 7 -
1.2.1. Tuberkulóza: její výskyt a rizika	- 9 -
1.2.2. Tuberkulóza: p vodci, p enos infekce, pr b h one m o c n í.....	- 9 -
1.2.3. Tuberkulóza: terapie	- 11 -
1.2.4. Antituberkulotika	- 12 -
1.2.4.1. Antituberkulotika první ady	- 12 -
1.2.4.2. Antituberkulotika druhé ady	- 14 -
1.2.4.3. Antituberkulotika nov vyvíjená	- 16 -
2. METODICKÁ ČÁST	- 21 -
2.1. P ÍPRAVA SUBSTITUOVANÉHO PYRAZINOVÉHO JÁDRA	- 21 -
2.2. HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA	- 22 -
2.3. AMINODEHALOGENACE	- 23 -
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 24 -
3.1. P ÍSTROJE A CHEMIKÁLIE	- 24 -
3.2. SCHÉMA PROVÁD ĚNÝCH REAKCÍ:	- 25 -
3.3. P ÍPRAVA 5-HYDROXY-6-METHYLPYRAZIN-2,3-DIKARBONITRILU	- 26 -
3.4. P ÍPRAVA 5-CHLOR-6-METHYLPYRAZIN-2,3-DIKARBONITRILU	- 26 -
3.5. OBECNÝ POSTUP P ÍPRAVY FINÁLNÍCH SLOU ĚNIN:	- 26 -
3.6. NOV P ÍPRAVENÉ SLOU ĚNINY:	- 27 -
3.6.1. 5-(ethylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	- 27 -
3.6.2. 5-methyl-6-(propylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	- 28 -
3.6.3. 5-(butylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	- 29 -
3.6.4. 5-(hexylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	- 30 -
3.6.5. 5-methyl-6-(oktylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril	- 31 -
4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ.....	- 32 -
4.1. VÝSLEDKY ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍHO HODNOCENÍ:	- 32 -
4.2. VÝSLEDKY ANTIFUNGÁLNÍHO HODNOCENÍ:.....	- 33 -
4.3. VÝSLEDKY ANTIBAKTERIÁLNÍHO HODNOCENÍ:	- 34 -
5. DISKUZE	- 36 -
6. P ÍLOHY	- 39 -
6.1. SPEKTRA FINÁLNÍCH SLOU ĚNIN	- 39 -
6.1.1. MK-1.....	- 39 -
6.1.2. MK-2.....	- 40 -
6.1.3. MK-3.....	- 42 -
6.1.4. MK-4.....	- 43 -
6.1.5. MK-5.....	- 45 -
6.2. VÝSLEDKY ANTIFUNGÁLNÍCH A ANTIBAKTERIÁLNÍCH TEST Ě 5-CHLOR-6-METHYLPYRAZIN-2,3-DIKARBONITRILU	- 46 -
7. ZÁV ĚR	- 48 -
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	- 49 -

Seznam použitých zkratk

KFCHKL – katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
tbc – tuberkulóza
WHO – světová zdravotnická organizace
MTC – *Mycobacterium tuberculosis complex*
PAS – *paraaminosalicylová kyselina*
BCG - *Bacillus Calmette – Guerin*
AT – antituberkulotika
XDR-TB - extensive multidrug resistance
MDR-TB - multi drug resistant tuberculosis
ATB – antibiotika
GIT – gastrointestinální trakt
MIC – minimální inhibiční koncentrace
ATP – adenosintrifosfát
KAOCH – katedra organické chemie
 $\log P$ – logaritmus rozdělovacího koeficientu
 $\text{Clog } P$ – logaritmus rozdělovacího koeficientu upravenými chemickými interakcemi
TLC – tenkovrstvá chromatografie
Hex – hexan
EtAc – ethyl-acetát
To – toluen
Ac – aceton
KBLV – katedra biologických a lékařských věd
 IC_{80} – 80% inhibice kontroly
DNA – deoxyribonukleová kyselina
HIV – human immunodeficiency virus
 pK_a – disociační konstanta
PZAasa – pyrazinamidasa
 KMnO_4 – manganistan draselný
HCl – kyselina chlorovodíková
DMSO – dimethylsulfoxid

Úvod

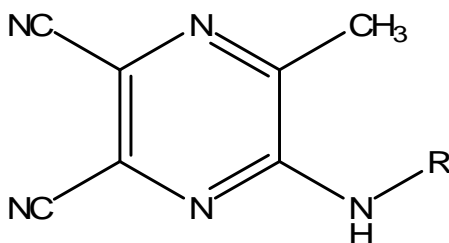
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv (KFCHKL) se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciální antituberkulotickou a antimykotickou aktivitou. Tato rigorózní práce je dílem píšícím k řešení výzkumných úkolů katedry.

Cíl práce

Cíl této rigorózní práce je pokusit se připravit biologicky aktivní (především se zaměřit na antituberkulotickou, případně antimykotickou aktivitu) deriváty pyrazinu.

Konkrétními úkoly jsou:

1. provést rešerši zaměřenou na současný výskyt tuberkulózy a možnosti její léčby (a už jsou současné nebo budoucí – perspektivní nová potenciální antituberkulotika).
2. otestovat nově připravené látky alespoň na antimykobakteriální a antifungální aktivitu
3. určit parametry lipofility nových látek

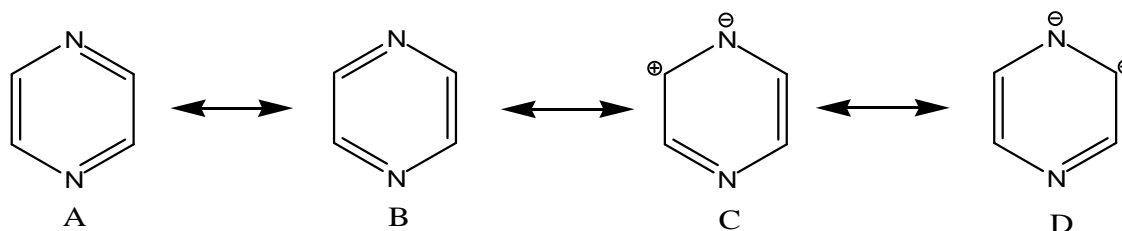


obecný vzorec připravovaných sloučenin

1. Teoretická část

1.1. Pyrazin

Pyrazin je slabě aromatičká molekula, má planární charakter, je slabě bazický (viz Tab.1).¹ Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid níže uvedených struktur (A-D).



Chová se podobně jako slabě dvojsytná base $pK_1 = 0,57$; $pK_2 = - 5,51$.² V porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je však bazí nejslabší (viz Tab.2).³

sloučenina	% aromaticity
benzen	100
pyridin	82
pyridazin	65
pyrimidin	67
pyrazin	75

Tab.1 srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly³

sloučenina	pK_a (1.stupeň)
pyridin	5,2
pyridazin	2,33
pyrimidin	1,3
pyrazin	0,65

Tab.2 srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů¹

Je charakterizován jako bílá krystalická zápachající látka. Je rozpustný ve vodě, vysoce hořlavý, dráždivý a hygroskopický. Teplota tání je 54 °C.⁴

Co se týče chemických vlastností, pyrazin nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např.: Friedel – Craftsovým alkylacím i acylacím. Je to z důvodu, že hustota elektronů je zvýšená na dusíkatých atomech, zatímco na uhlíkových atomech je hustota výrazně menší. Při elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíku, a tedy existencí rezonančních struktur. Ty jsou příčinou kladného náboje uhlíku heterocyklického kruhu.

Výhodnější je proto substituce nukleofilní, zvláště pokud je pyrazinové jádro aktivováno *N*-oxidací.¹

Pyrazinové deriváty mají důležitou farmaceutickou úlohu. Pyrazinový kruh může být důležitou obměnou ve složeninách, které napodobují peptidové molekuly. Význam pyrazinu pro biologickou aktivitu můžeme vyhodnotit z hlediska velikosti molekuly a příspěvku ovlivnění výsledných fyzikálně-chemických vlastností. Objemné složeniny obsahující pyrazinový kruh mají specifické chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti celé molekuly (bazický, slabý heteroaromatický charakter).² Relativně malá molekula pyrazinového kruhu je nutná pro úinek v případě analogie s přirozeně působícími složeninami, například: nikotinamid, izosterie s nukleovými bázemi odvozených od pyrimidinu a purinu, která je typickou modifikací využívanou při vývoji antimetabolitů ve skupině antineoplastiků a antivirotik.

1.2. Tuberkulóza

1.2.1. Tuberkulóza: její výskyt a rizika

Tuberkulóza (tbc) je závažné infekční onemocnění vyvolávané bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Podle mezinárodní zdravotnické organizace (WHO) je tbc jeden z nejtěžších zdravotnických problémů.⁵ Ze statistik vyplývá, že třetina světové populace je infikována tbc, ročně se nakazí podobně dalších 9 milionů lidí, 2 miliony na ní zemou. Další statistická data mluví o tom, že 95 % lidí s aktivní tbc žije v rozvojových zemích, a že 99 % úmrtí způsobených tuberkulózou připadá na pacienty žijící v rozvojových zemích.⁶

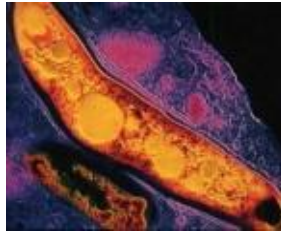
Mezi oblastmi s nejvyšším výskytem tbc patří: země bývalého Sovětského svazu, subsaharská Afrika, jihovýchodní Asie. Zjistilo se, že ve všech oblastech světa existují nemalé skupiny obyvatel s oslabenou buněnou imunitou, u nichž je vyšší pravděpodobnost vzniku onemocnění. Mezi tyto skupiny řadíme osoby se sníženou imunitou buněného typu pro závažná onemocnění typu AIDS, pro léčbu imunosupresivy a cytostatiky, ale také sociální skupiny narkomanů, bezdomovců, atd.⁷

Právě šíření tbc společně s HIV infekcí na africkém kontinentu představuje závažný problém. Počet pacientů, kteří jsou souasně infikováni virem HIV a tbc je odhadován asi na 4,5 milionů. Jde o to, že jedna nemoc urychluje progresi druhé nemoci, a tím pádem představuje tbc jeden z důvodů vysoké úmrtnosti HIV pozitivních pacientů.⁸

1.2.2. Tuberkulóza: původci, přenos infekce, průběh onemocnění

Původcem tuberkulózy jsou aerobní, nepohyblivé, grampozitivní, acidorezistentní, intracelulárně žijící, pomalu rostoucí bakterie řadí se mezi tzv. *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC). Jako dominantní příčina tuberkulózy figuruje druh *Mycobacterium tuberculosis* (viz obr.1). Dalšími mykobakteriemi, které se řadí do tohoto komplexu a způsobují onemocnění, jsou druhy *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* = tzv. atypická mykobakteria. Vedle těchto mykobakterií existují i druhy (nontuberculosis) vyvolávající

onemocnění velmi podobné tuberkulóze. Jde například o *Mycobacterium kansasii* i *Mycobacterium avium complex*.⁹



obr.1 *Mycobacterium tuberculosis* ⁶

Zvláštností je především silná buněčná stěna, ve které je vysoký podíl lipidních látek (až 40 %), a proto má vysoce hydrofobní charakter. Kromě klasických složek (peptidoglykan, lipidová dvojvrstva, atd.) obsahuje jejich buněčná stěna další acylipidy, mykolové kyseliny, které jsou kovalentně navázány na arabinogalaktany a vytvářejí silnostnný komplex. Z tohoto důvodu je pro praktické antituberkulotické působení silná lipofilita, respektive log P, léčiva i nové látky.

Mykobakterie se šíjí vzdušnou cestou, do organismu vstupují dýchacími cestami, jde tedy o kapénkový přenos infekce. Podle lokalizace se tbc rozděluje na plicní (asi 80 % případů) a mimoplicní (asi 20 % případů), mohou být postiženy ledviny, kůže a podkoží, stěna, ...).

Při setkání organismu s infekcí může organismus reagovat následujícími způsoby: A) organismus není infikován

B) organismus je infikován, ale nedojde k manifestnímu onemocnění

C) propukne manifestní onemocnění primární x sekundární tbc

Primární tbc je lokalizované plicní onemocnění, u kterého imunitní odpověď jinak zdravého člověka, zastaví šíření bacilů. Infikovaná tkáň může kalcifikovat. Mykobakterie v ložisku jsou však životaschopné a mohou se kdykoli aktivovat. Aktivace do tzv. sekundární tbc postihuje asi 10 – 15 % infikovaných. V postižené tkáni se mohou objevit granulomy nebo tuberkly (uvnitř nekrotické, na povrchu lem zánětlivých buněk), které se mohou objevit i v jiných mimoplicních tkáních. Příznaky aktivní tbc nejsou specifické: únava, ztráta hmotnosti, zvýšená teplota, chronický kašel někdy doprovázený hemoptýzou.¹⁰

1.2.3. Tuberkulóza: terapie

Cílem terapie tbc je vyléčení nemocného, prevence následků tbc a relaps, zamezení přenosu na ostatní osoby.¹¹ Cílem antituberkuloticky účinných léků jsou biochemické pochody, kterými jsou syntetizovány makromolekuly – bílkoviny (streptomycin), nukleové kyseliny (paraaminosalicylová kyselina, PAS), biopolymery buněčné stěny. DNA-topoizomerasa, isocitrátlyasa jsou důležitá enzymy, které představují důležitá místa zásahu nových antituberkulotik.¹²

Jedinou prevencí nakažení se tbc je očkování. Spoléhá v aplikaci oslabeného kmenu *M. bovis*. Tento kmen společně vykultivovali Calmette a Guerin v roce 1921. Tento kmen byl na jejich počest pojmenován *Bacillus Calmette – Guerin* (BCG). Očkování se provádí u novorozenců a kojenců do jednoho roku života. Ve dvou letech života se provádí kontrolní tuberkulinový test a v případě negativní lokální reakce se provede očkování. Od roku 2001 se v ČR užívá dánská vakcína SSI Kopenhagen, která je připravena z dánského kmene 1331.¹³

Samotná léčba tuberkulózy, vzhledem k narůstajícímu nebezpečí rezistence a nedostatku antituberkulotik, se uskutečňuje v kombinacích antituberkulotik (AT). Léčebný program je rozdělený do dvou fází: iniciální a pokračovací.

Ke standardní kombinaci patří isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol (= antituberkulotika 1. řady) v iniciální fázi (2 – 3 měsíce) a dochází tím k negativnímu nálezu ve sputu v 90 % případů.¹⁴ Cíle této fáze léčby je rychlá eliminace aktivně se množících mykobakterií v zánetlivých ložiscích, ale i těch, které se vyskytují mimo mikrořagy.⁸

Poté následuje pokračovací fáze ve které se pokračuje další 4 měsíce už pouze ve dvojkombinaci: isoniazid, rifampicin¹⁴. V této fázi léčby se eliminují mykobakterie přežívající v uzavřených kaseózních kavernách nebo uvnitř mikrořag^{7,12}. Po šesti až sedmi měsících se dosahuje 95% úspěšnosti léčby bez relapsů.

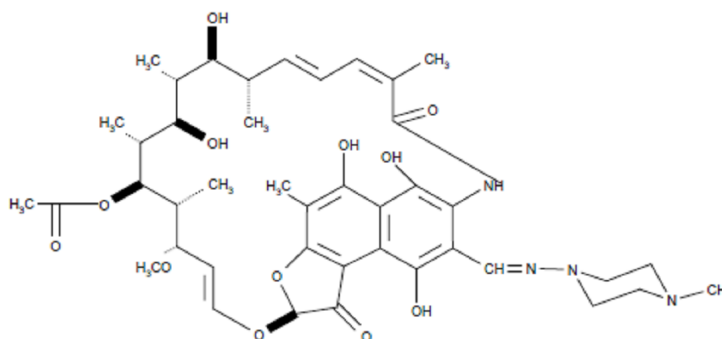
Komplikací léčby je rezistence, která se dělí na monorezistenci, polyrezistenci a multirezistenci. Monorezistentní je takový kmen *M. tuberculosis*, který je in vitro rezistentní pouze k jednomu AT první řady.

Polyrezistentní se rozumí rezistence kmene na více než jedno AT první řady mimo současně se vyskytující rezistenci na isoniazid a rifampicin. Rezistence minimálně na kombinaci isoniazidu a rifampicinu se nazývá multirezistence.⁸ V roce 2006 byly zaznamenány případy tzv. XDR-TB (extensive multidrug resistance). Podle definice WHO je to onemocnění, které je kromě rezistence na isoniazid a rifampicin, odolné vůči jakýmkoli fluorochinolonovým antibiotikům a jednomu ze tří parenterálně podávaných antibiotik (kapreomycin, kanamycin, amikacin)¹⁵. Hovoří se, že XDR-TB tvoří v dnešní době 4 – 19 % všech MDR-TB (multi drug resistant tuberculosis).

1.2.4. Antituberkulotika

1.2.4.1. Antituberkulotika první řady

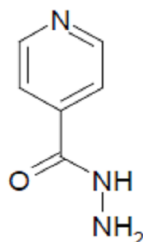
Rifampicin



Je polysyntetické ansamycinové antibiotikum (ATB). Působí i na atypická mykobakteria, například *M. avium*, a účinkuje jak na dlečící se, tak na klidová stadia onemocnění.

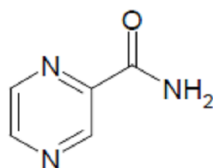
Mechanismus účinku spoívá v inhibici DNA-dependentní-RNA-polymerasy a tím pádem působí baktericidně na množící se mykobakteria. Bakterie jsou na toto antibiotikum zídka rezistentní (méně než 1 %) a neexistuje zklížená rezistence s ostatními antituberkulotiky.¹⁶

Isoniazid

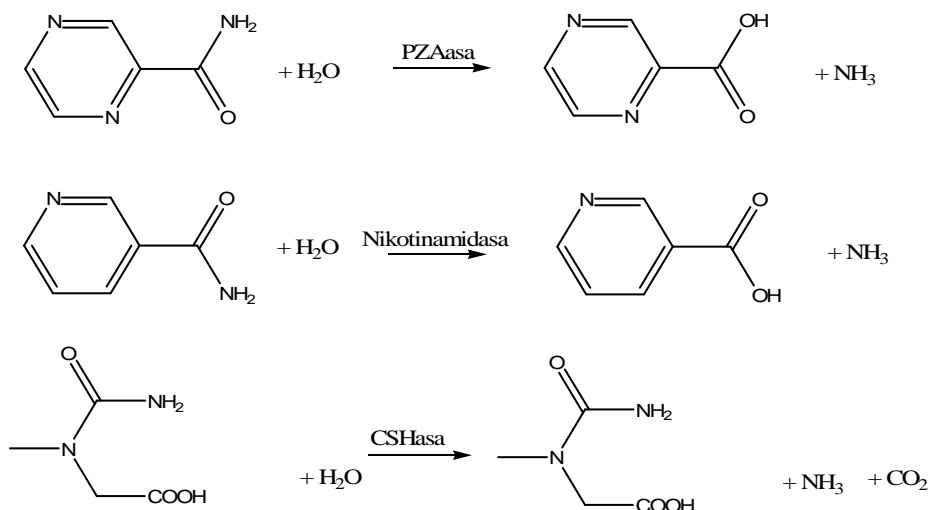


P sobí baktericidn na proliferující se bakterie. Lehce prostupuje mykobakteriální bun nou st nou, kde se p em uje na isonikotinovou kyselinu, která se v bu ce bakterie kumuluje. Pravd podobn interferuje s kyselinou nikotinovou, to narušuje syntézu kyseliny mykolové, která je specifickou sou ástí bun né st ny.¹⁶ Je ú inný i na klidová stádia *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*.

Pyrazinamid



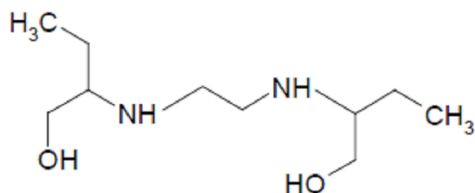
Pyrazinamid je nikotinamidový analog, prolé ivo, které je p em n no na aktivní baktericidní formu, pyrazinkarboxylovou kyselinu, pomocí enzymu pyrazinamidasy (PZAasa, viz obr.2). Tento mechanismus ú inkú i mechanismus rezistence není dosud pln objasn n.¹⁷ D ležitá pro jeho ú inek je kyselé pH kaseózních ložisek. Je ú inný na nerostoucí mykobakteria v intracelulárním prostoru mikrofág , kam rifampicin a isoniazid neproniknou. Snižuje p edevším dobu trvání lé by, proto je vhodný ke kombinacím se dv ma p edcházejícími lé ivy.¹⁸



obr.2

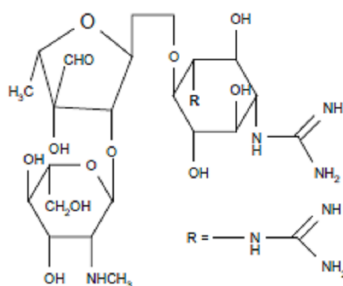
Bakteriální PZAasa/nikotinamidasa p em uje pyrazinamid na amoniak a pyrazinkarboxylovou kyselinu, která je aktivní proti *Mycobacterium tuberculosis*. Ztráta PZAasy aktivity je hlavní mechanismus rezistence mykobakterií v i pyrazinamidu (to bylo ur eno na kmeni *Pyrococcus horikoshii* 999, repsektive na jeho PZAase. Vazebné místo pro tento enzym je podobné pro *N*-karbamoylsarkosin amidohydrolasu, protein s neznámou fyziologickou funkcí).¹⁹

Ethambutol



Ethambutol působí bakteriostaticky proti množícím se mykobakteriím. Je vhodný pouze ke kombinované terapii, používá se zvláště, pokud se u pacienta vyskytne rezistence k jiným antituberkulotikům.¹⁶

Streptomycin



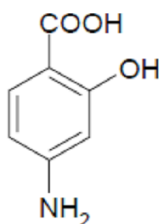
Streptomycin je antibiotikum, aminoglykosid, které působí baktericidně. Jedná o historicky první léivo, které se začalo používat při léčbě tuberkulózy. Téměř neopouští extracelulární prostor. Jeho nevýhodou je relativně rychle vznikající rezistence, proto se podává pouze v kombinacích s jinými antituberkulotiky. Používá se rovněž k terapii zvláštních forem tuberkulózy.¹⁶

1.2.4.2. Antituberkulotika druhé řady

Pro tyto látky je příznačný menší léčebný efekt a vyšší výskyt závažnějších nežádoucích účinků.

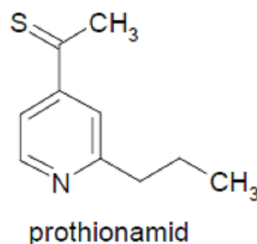
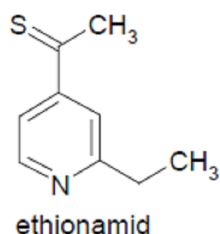
Do této skupiny řadíme další aminoglykosidové ATB (kanamycin), polypeptidové ATB (kapreomycin), fluorochinolonová ATB a tzv. rezervní léiva (PAS, ethionamid, prothionamid, terizidon), kde poměr přínosu a rizika není tolik výhodný a používají se pouze v případech, kdy ostatní zmíněná léiva jsou neúčinná nebo selhala.

Paraaminosalicylová kyselina



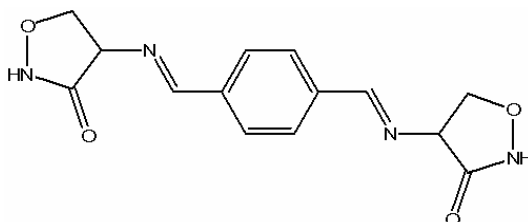
Dnes již obsoletní. Je zapotřebí vysokých denních dávek. Silně dráždí zažívací trakt. Používá se k terapii multirezistentních kmenů.

Ethionamid, Prothionamid



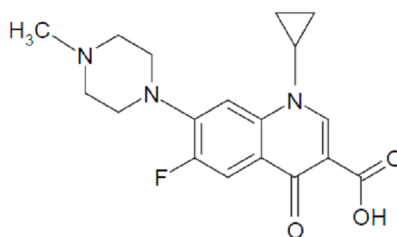
Deriváty kyseliny isonikotinové. Působí bakteriostaticky, poměrně rychle se vyvíjí rezistence.

Terizidon



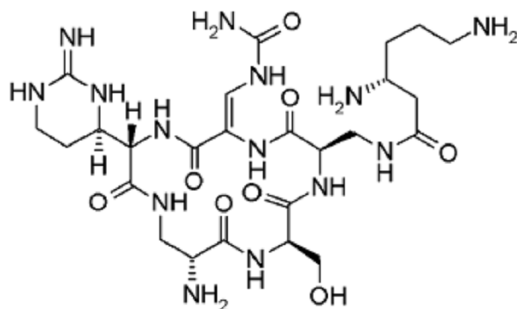
Terizidon obsahuje v molekule dva cykloserinové podíly, můžeme ji proto hodnotit jako cykloserin. Kvůli nežádoucím účinkům na centrální nervový systém (konvulze, somnolence, tremor, parézy, riziko epileptického záchvatu) se téměř nepoužívá.

Fluorochinolony



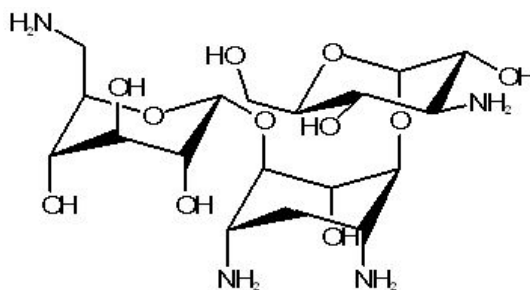
Mezi hlavní antituberkuloticky aktivní fluorochinolony se řadí ciprofloxacín a ofloxacín. Mají baktericidní aktivitu. Mechanismus působení spoívá v inhibici DNA-gyrasy.

Kapreomycin



Kapreomycin je polypeptidová ATB s bakteriostatickým úinkem. Má častou rezistenci s kanamycinem. Nevstřebává se z GIT, proto se podává pouze parenterálně. Podává se s ostatními antituberkulotiky, aby bylo možné podat co nejmenší dávku.

Kanamycin



Kanamycin je aminoglykosidové ATB. Podává se pouze parenterálně. Používá se jen v terapii tbc pro své nežádoucí účinky.

1.2.4.3. Antituberkulotika nově vyvíjená

Tuberkulóza, zvlášt MDR-TB, je velmi vážný zdravotnický problém a vývoj nových antituberkulotik se jeví jako velmi nutný. Nejlépe to vystihuje fakt, že během 40 let od zavedení rifampicinu (krom rifabutinu a rifapentinu), nebyla zavedena v USA a/nebo jiné zemi zavedena žádná nová látka. Mezi nově vyvíjená antituberkulotika patří látky ze skupin nitroimidazol (nitroimidazopyrany a nitroimidazooxazoly), diarylchinolin a oxazolidin.²⁰

Nově vyvíjené látky proti tuberkulóze by měly splňovat následující 3 body¹⁸:

- A) vyvíjená látka by měla umožnit snížit délku léčby tuberkulózy
- B) vyvíjená látka by měla být aktivní i proti rezistentním kmenům
- C) vyvíjená látka by měla působit i proti „spícím“ mykobakteriím, t.j. latentní nebo atypická mykobakteria, jejichž rezistence je neidentifikovaný do té doby, dokud není hostitelský imunitní systém oslaben

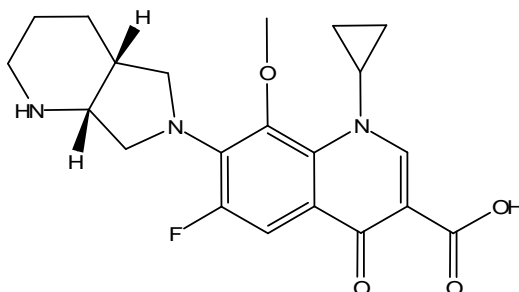
Fluorochinolony¹⁸

Fluorochinolony (ciprofloxacin, levofloxacin) jsou důležitá skupina látek, a koliv nemají žádnou nově objevenou látku. Nejsou zpráva o tom, že by existovala zkládaná rezistence mezi ostatními klasickými antituberkulotiky. Další výhodou fluorochinolonů je ta, že mají nízkou incidenci a vážnost nežádoucích účinků.

Fluorochinolony mohou být použity jako léčiva první linie v kombinaci s ostatními antituberkulotiky u dlouhotrvající léčby tuberkulózy, zvláště u HIV pozitivních pacientů.

8-methoxychinolony, moxifloxacin (viz obr.3) a gatifloxacin, jsou slibné látky pro terapii tuberkulózy. Mají nejvyšší *in vitro* i *in vivo* aktivitu ze všech existujících a vyvinutých fluorochinolonů (nejnižší MIC – minimální inhibiční koncentrace). Mají silnou účinnost v kombinaci s isoniazidem nebo rifampicinem (s tím má dokonce stejnou aktivitu u lidské plicní tuberkulózy).

To poukazuje na jejich možné použití jako léčiv první linie. Především u prokázané MDR-TB a pacientů, kde se vyskytly vážné nežádoucí účinky na léčiva první linie.



obr.3 moxifloxacin

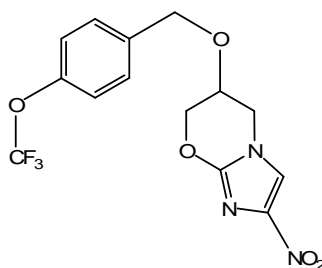
Nitroimidazolové sloučeniny¹⁸

Mnoho nitroimidazolů, zvláště imidazooxazol a imidazooxazin, bylo testováno pro jejich silnou *in vitro* i *in vivo* antituberkulotickou aktivitu. Ovšem zároveň jejich silná karcinogenita a mutagenita brání jejich uvedení na trh.

Zatím prakticky každý testovaný nitroimidazol má mutagenní potenciál, a proto musí být u nich tato vlastnost znatelně redukována. Za tuto vlastnost může pravděpodobně nitro skupina v poloze 5.

Nitroimidazopyran PA-824

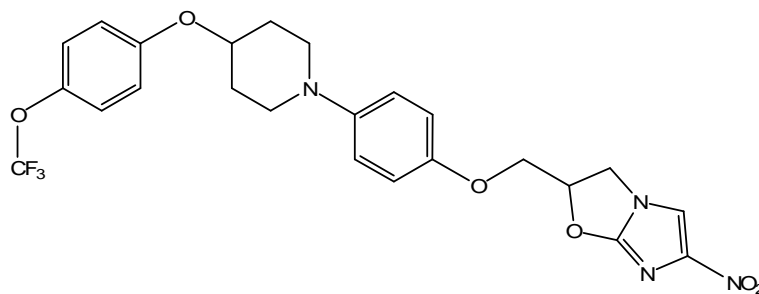
PA-824 (viz obr.4) je nejvíce slibnou sloučeninou ze skupiny derivátů odvozených od 5-nitroimidazolu CGI-17341. Je velmi aktivní proti MDR-TB a působí i proti „spícím“ mykobakteriím. Kromě toho má znatelně redukován mutagenní potenciál (nevykazuje mutagenitu v „Ames“ testech). Nevykazuje získanou rezistenci s ostatními používanými antituberkulotiky. Při pokusech na myších byl po relapsu po kompletní 6 měsíční léčbě (2 měsíce: rifampicin/pyrazinamid/PA-824, 4 měsíce: rifampicin/PA-824) trochu vyšší než v případě klasického léčebného schématu. Látka je nyní v 2. fázi klinických testů.



obr.4 PA-824

Nitroimidazooxazoly

OPC-67683 (viz obr.5), strukturální analog nitroimidazolu CGI-17341 s odlišnou substitucí v poloze 2. Tato sloučenina má velmi nízkou MIC na isoniazid a rifampicin rezistentní kmeny, tak i na klasická mykobakteria. OPC-67683 vykazuje vyšší antituberkulózní aktivitu a bezpečnost (také redukovanou mutagenitu) ve srovnání s PA-824. Tato látka je rovněž ve 2. fázi klinického hodnocení.

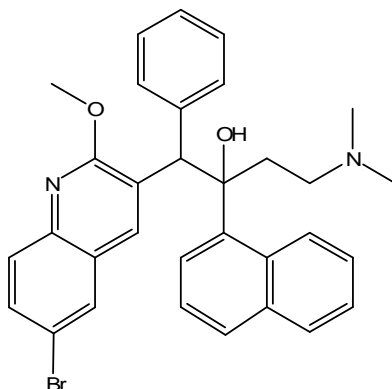


obr.5 OPC-67683

Diarylchinoliny¹⁸

Mezi nejvíce slibné látky této skupiny nových potenciálních antituberkulotik patří i látka, která nese označení TMC-207 (dříve R207910, viz obr.6). Její mechanismus účinku se zaměřuje na ATP (adenosintrifosfát) syntézu mykobakterie. Tato sloučenina je účinná na téměř všechny mykobakteriální druhy nevyjímaje *M. kansasii*, *M. avium* komplex, *M. fortuitum*.

TMC-207 vykazuje in vitro obdobný účinek na mykobakteria, která jsou rezistentní na isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol a pyrazinamid. Proto můžeme vyloučit získanou rezistenci s již používanými antituberkulotiky. Tato látka je velmi slibnou na léčbu MDR-TB a XDR-TB. V současnosti se nachází ve 2. fázi klinického hodnocení.



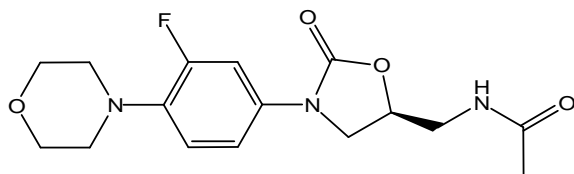
obr.6 TMC-207

Oxazolidiny¹⁸

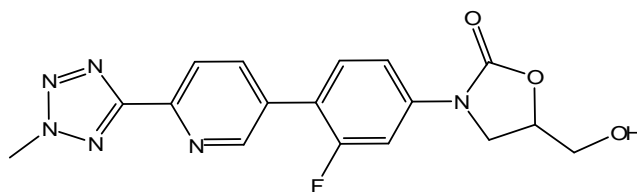
Mezi tyto látky řadíme: linezolid (viz obr.7), eprezolid, P NU-100480, DA-7157 (viz obr.8), RBx 8700 (viz obr.9). Jedná se o látky velmi dobře aktivní proti tbc. Jedná se o skupinu sloučenin, které mají řadu netušených vlastností:

- unikátní mechanismus účinku, který zahrnuje inhibici syntézy proteinů prostřednictvím interference s iniciačním komplexem. Díky tomu se zatím nevyskytla získaná rezistence s jinými antituberkulotiky.
- spektrum účinku zahrnuje i další bakteriální kmeny
- dokonalá biologická dostupnost po orálních i parenterálních podání
- nízké riziko vzniku rezistentních kmenů

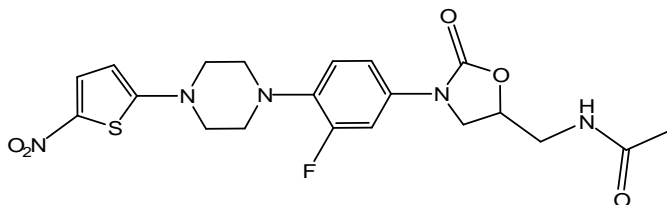
Mezi nežádoucí účinky linezolidu patří periferní neuropatie a útlum kostní dřeně. Proto byl schválen pro klinické použití. Po zjištění in vivo aktivity, farmakokinetiky, nežádoucích účinků nově syntetizovaných látek (DA-7157, RBx 8700) se dá počítat s tím, že budou uvolněny do klinického testování.



obr.7 linezolid



obr.8 DA-7157



obr.9 RBx 8700

2. Metodická část

2.1. Příprava substituovaného pyrazinového jádra

Pyrazinové jádro de novo lze připravit autokondenzací α -aminokarbonylových sloučenin (viz Schéma 1) i kondenzací α -diaminů s α -dikarbonylovými sloučeninami (viz Schéma 2).²¹ Tímto způsobem se v tšinou získávají směsi různých substituovaných derivátů pyrazinu.

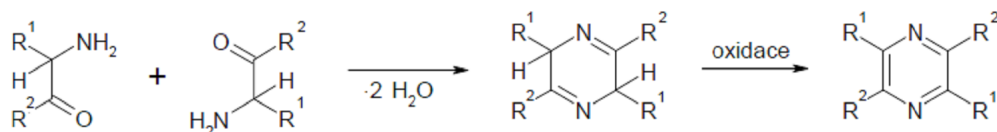


Schéma 1: autokondenzace α -aminokarbonylových sloučenin

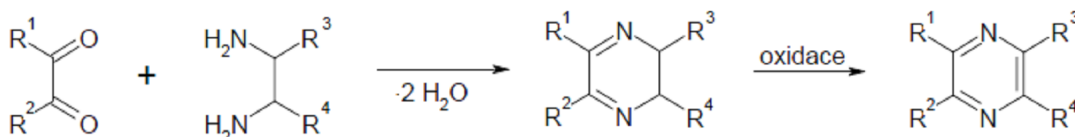


Schéma 2: kondenzace α -diaminů s α -dikarbonylovými sloučeninami

Další metoda přípravy pyrazinového jádra de novo za jinou syntézou chinoxalinu, reakcí glyoxalu s *o*-fenyldiaminem ve vodě s výtžkem 85 – 90 % (viz Schéma 3-1). Benzenové jádro rozštěpíme pomocí horkého vodného roztoku KMnO_4 (viz Schéma 3-2). Směs se ochladí na pokojovou teplotu a okyselí 36% HCl (viz Schéma 3-3). Tato reakce nám dá 2,3-pyrazinkarboxylovou kyselinu s výtžkem 75 – 77 %.²²

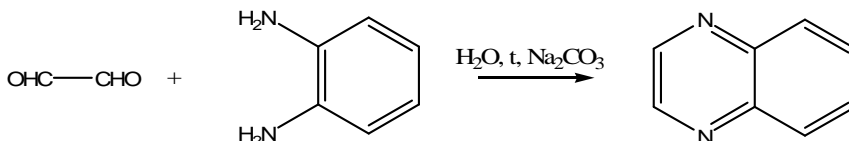


Schéma 3-1

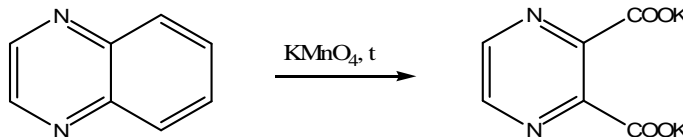


Schéma 3-2

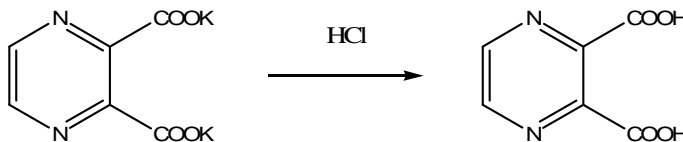


Schéma 3-3

Další reakce spoívá v kondenzaci α -karbonylové karboxylové kyseliny a β -diaminoslou eniny (viz Schéma 4). Výt žek této reakce se pohybuje podle zvolené α -karbonylové karboxylové kyseliny v rozmezí 21 – 98 %, vztáhnuto na p íslušný 5-hydroxypyrazin. V našem p ípad se jedná o diaminomaleonitril a 2-oxopropanovou kyselinu.²⁵

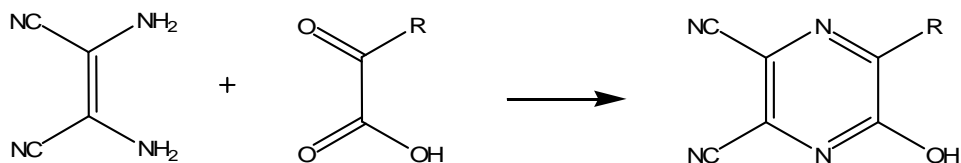


Schéma 4: kondenzace α -karbonylové karboxylové kyseliny a diaminomaleonitrilu

2.2. Halogenace pyrazinového jádra

Halogenpyraziny tvo í d ležitou skupinu slou enin, protože umož ůjí v ým nu atomu halogenu za nukleofil u jinak špatn ě dostupných derivát pyrazinu.

Halogenderiváty se dají p ípravit t ěmi klasickými zp soby. První zp sob je založen na p ímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi. Druhou metodou je zám na hydroxyly nebo *aminoskupiny* na pyrazinu halogenem p sobením chloridu nebo bromidu fosforylu. Nej ast jším zp sobem zisku halogenderivát je nukleofilní halogenace *N*-oxid pyrazinu (viz Schéma 5).

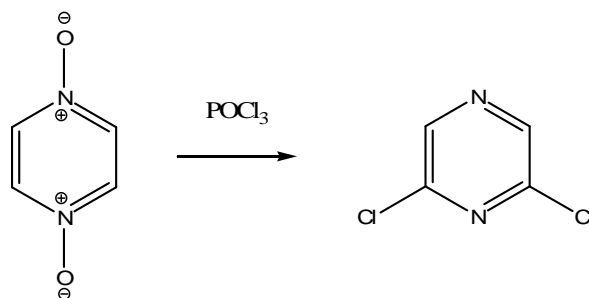


Schéma 5

Chlorace pyrazin-*N,N*-dioxidu pomocí fosforylchloridu jako chlora ního inidla

Chlorace 5-hydroxypyrazinu s fosforyl chloridem (viz Schéma 6) nám dá p íslušný 5-chlorderivát s v ýt žkem 21 – 98 %.²⁵

V našem p ípad se jedná o zp sob druhý, tedy zám na *hydroxyly* za atom chloru p sobením chloridu fosforylu.²⁵

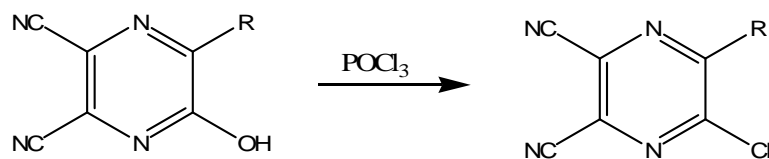


Schéma 6: chlorace 5-hydroxypyrazinu s fosforyl chloridem

2.3. Aminodehalogenace

Substituční reakce chlorderivátů pyrazinu patří mezi velmi oblíbené reakce. Vedle alkylothio- a arylthiodehalogenace se často využívá i aminodehalogenace alifatickými i aromatickými aminy²³ (viz Schéma 7).

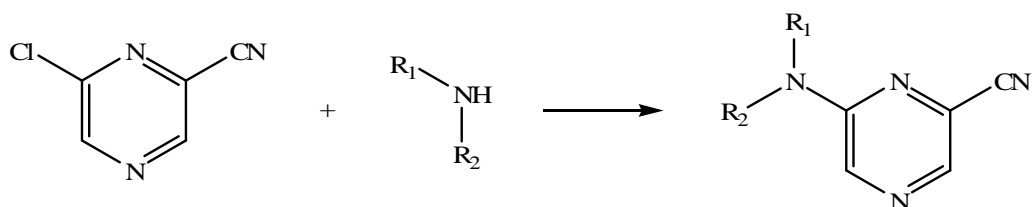


Schéma 7: aminodehalogenace alifatickým/aromatickým aminem

Při syntéze arylaminoderivátů dusíkatých šestičlenných heterocyklů lze využít nukleofilní substituci v provedení podle Bankse²⁴ (viz Schéma 8). Při přípravě těchto látek provádí Banks ve vodném prostředí při kyselém pH. Kyselina chlorovodíková zde vystupuje jako katalyzátor.

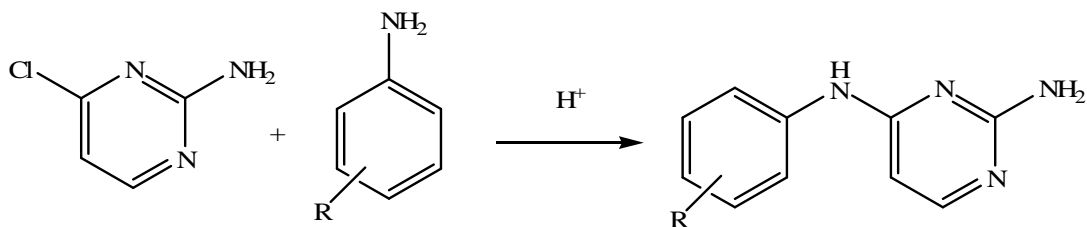


Schéma 8: nukleofilní substituce podle Bankse

V našem případě se jedná o náhradu atomu chloru za aminoskupinu primárních alifatických aminů s různou délkou alifatického řetězce (viz Schéma 9).²⁵

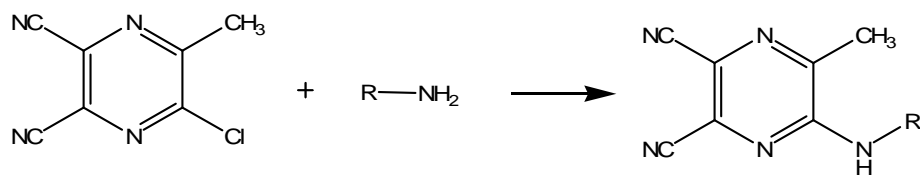


Schéma 9: aminodehalogenací reakce

3. Experimentální část

3.1. Pístroje a chemikálie

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách Merck, Silica gel 60 F254, za použití vyvíjecí soustavy hexan – ethyl-acetát (1:1) a toluen – aceton (1:1). Detekce byla prováděna na UV záření o vlnové délce 254 nm.

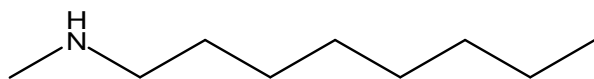
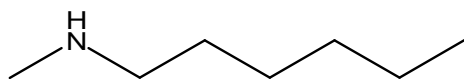
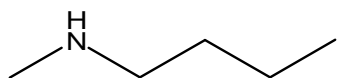
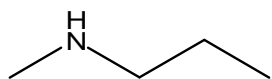
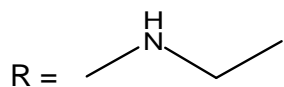
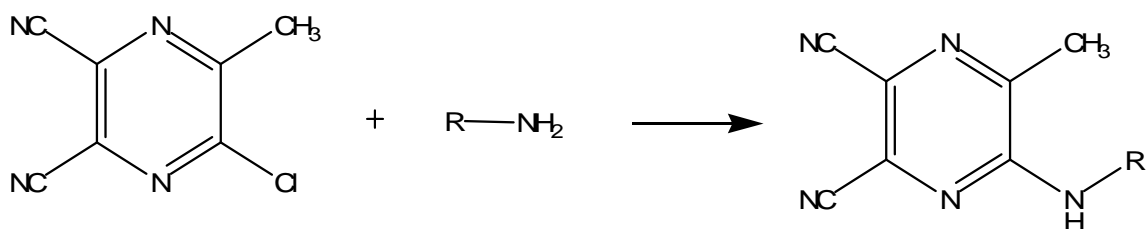
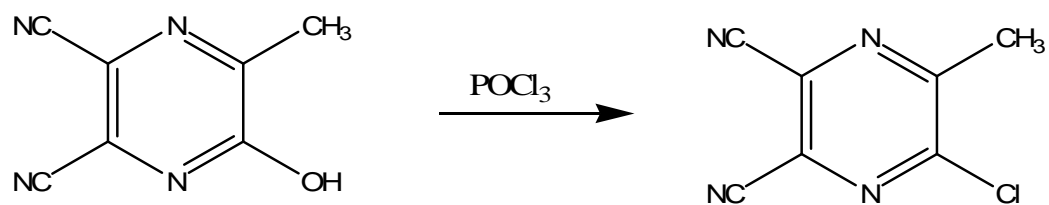
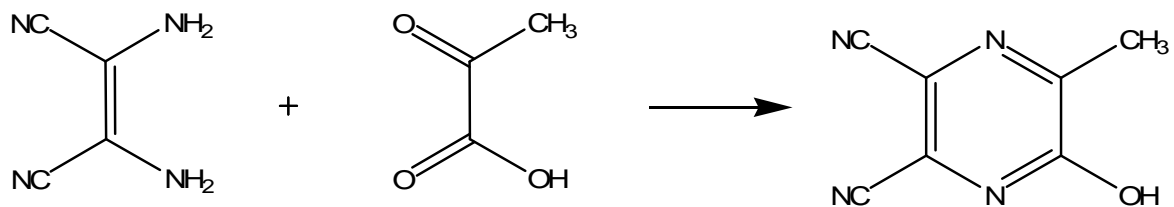
Teploty tání byly stanoveny na pístroji Stuart Scientific, SMP3, Bibby Sterling LTD, UK.

Infračervená spektra byla změřena na pístroji Nicolet Impact 6700 (Smart MIRacle™ ATR ZnSe, Nicolet™ 6700 FT-IR Spectrometer, Thermo Scientific, USA) na katedře anorganické a organické chemie (KAOCH) FaF UK p. Ivou Vencovskou.

¹H a ¹³C NMR spektra byla naměřena na pístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pro ¹H a 75,43 MHz pro ¹³C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k Si(CH₃)₄.

Lipofilita, respektive log *P* (logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi *n*-oktanolem a vodou), byla vypočítána pomocí programu CS ChemOffice Ultra ver. 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Hodnoty Clog *P* (logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi *n*-oktanolem a vodou upravený na základě chemických interakcí v molekule dané látky) byly získány z programu CS ChemOffice Ultra ver. 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.).

3.2. Schéma prováděných reakcí:



3.3. Příprava 5-hydroxy-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Směs diaminomaleonitrilu (0,02 mol), 2-oxopropionové kyseliny (0,02 mol), kyseliny chlorovodíkové (50 ml) a methanolu (40 ml) byla míchána při stálé teplotě po dobu dvou hodin a následně byla zchlazena. Vysrážený produkt byl rekrystalizován z benzenu. Výťažek činil přibližně 30%.²⁵

3.4. Příprava 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

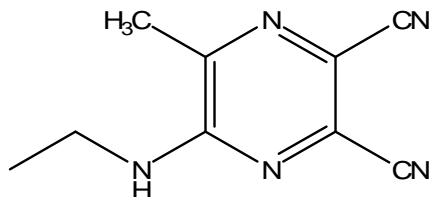
Roztok 0,02 molu 5-hydroxy-6-methylpyrazinu-2,3-karbonitrilu v fosforylchloridu (30 g, 0,2 molu) byl ochlazen na 0 °C. Při zahívání bylo přidáno 0,028 molu pyridinu a směs byla zahívána na 90 °C a při této teplotě byla zahívána pod vzdušným chladičem 2 hodiny. Poté byl produkt extrahován do chloroformu. Rekrystalizace byla provedena za použití benzenu.²⁵

3.5. Obecný postup přípravy finálních sloučenin:

0,0011 molu 5-chlor-6-methylpyrazinu-2,3-dikarbonitrilu bylo rozpuštěno v 25 ml vysušeného toluenu. K této směsi byla přikapávána směs 15 ml vysušeného toluenu s 0,0028 molu příslušného aminu (2,5 násobek navážky výchozí látky). Bylo přidáno ještě 10 ml vysušeného toluenu a směs byla zahívána při teplotě 135 °C 50 až 60 minut pod vzdušným chladičem. Po zchladnutí reakční směsi se odpařilo za sníženého tlaku rozpouštědlo a vypadly krystaly produktu. Produkt byl rekrystalizován z ethanolu a vody. Průběh reakce a čistota produktu byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) za použití dlečích soustav: hexan – ethyl-acetát (Hex:EtAc) 1:1 a toluen – aceton (To:Ac) 1:1). Na závěr se změnila teplota tání (t.t.) výsledného produktu.

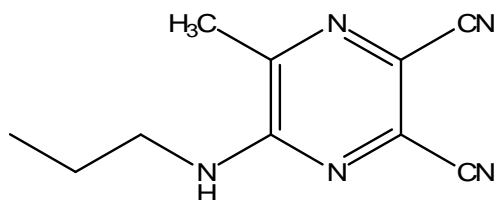
3.6. Nov p ipravené slou eniny:

3.6.1. 5-(ethylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



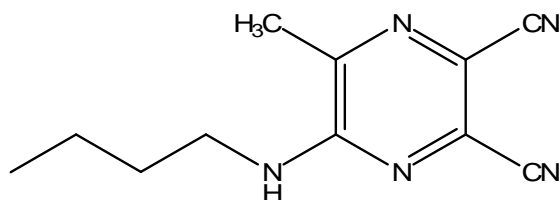
ozna ení	MK-1
sumární vzorec	C ₉ H ₉ N ₅
molekulová hmotnost [g/mol]	187,2
výt žek	125,7 mg (61,35 %)
teplota tání [°C]	136 – 138
R _f	0,32
elementární analýza	vypo teno: C 57,74 %; H 4,85 %; N 37,41 % nam eno: C: 57,50 %; H 4,68 %; N 27,48 %
¹ H NMR spektrum []	5.56 (1H, bs, NH), 3.57 (2H, q, J=7.4 Hz, CH ₂), 2.46 (3H, s, CH ₃), 1.30 (3H, t, J=7.4 Hz, CH ₃)
¹³ C NMR spektrum []	152.6, 145.4, 130.8, 118.8, 114.8, 114.0, 36.8, 20.4, 14.1
I spektrum [cm ⁻¹]	3368 (NH), 2980 (CH ₃), 2890 (C ₂ H ₅), 2224 (CN), 2228 (CN), 1572 (pyrazin), 1541 (NH), 1401, 1370, 1201 (pyrazin)

3.6.2. 5-methyl-6-(propylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril



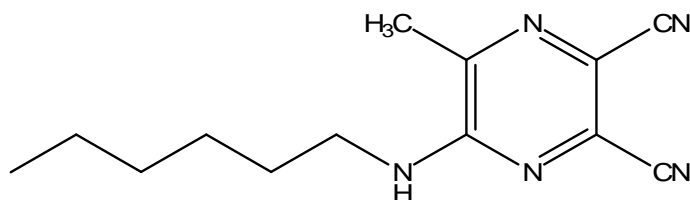
ozna ení	MK-2
sumární vzorec	C ₁₀ H ₁₁ N ₅
molekulová hmotnost [g/mol]	201,2
výt žek	64 mg (63,24 %)
teplota tání [°C]	149,5 – 151
R _f	0,42
elementární analýza	vypo teno: C 59,69 %; H 5,51 %; N 34,80 %
	nam eno: C 59,77 %; H 5,76 %; N 34,62 %
¹ H NMR spektrum []	5.51 (1H, bs, NH), 3.54-3.45 (2H, m, CH ₂), 2.47 (3H, s, CH ₃), 1.77-1.61 (2H, m, CH ₂), 1.00 (3H, t, J=7.4 Hz, CH ₃)
¹³ C NMR spektrum []	152.7, 145.3, 130.8, 118.8, 114.8, 114.0, 43.5, 22.0, 20.4, 11.3
I spektrum [cm ⁻¹]	3383 (NH), 2971 (CH ₃), 2850 (C ₃ H ₇), 2361 (CN), 2227 (CN), 1541 (NH), 1516, 1401, 1362, 1251, 1199 (pyrazin)

3.6.3. 5-(butylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



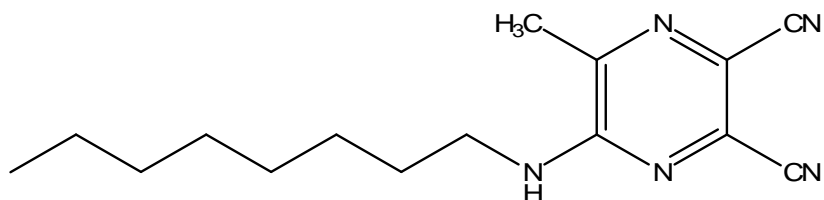
ozna ení	MK-3
sumární vzorec	$C_{11}H_{13}N_5$
molekulová hmotnost [g/mol]	215,3
výt žek	147,4 mg (73,26 %)
teplota tání [°C]	111 - 113
R_f	0,51
elementární analýza	vypo teno: C 61,38 %; H 6,09 %; N 32,54 % nam eno: C 61,43 %; 6,36 %; N 32,44 %
1H NMR spektrum []	5.50 (1H, bs, NH), 3.60-3.45 (2H, m, CH_2), 2.46 (3H, s, CH_3), 1.73-1.57 (2H, m, CH_2), 1.50-1.32 (2H, m, CH_2), 0.97 (3H, t, $J=7.3$ Hz, CH_3)
^{13}C NMR spektrum []	152.7, 145.3, 130.8, 118.7, 114.8, 114.0, 41.5, 30.8, 20.4, 20.0, 13.7
I spektrum [cm^{-1}]	3389 (NH), 2942 (CH_3), 2857 (C_4H_9), 2247 (CN), 2223 (CN), 1580 pyrazin, 1540 (NH), 1520, 1401, 1369, 1180 (pyrazin)

3.6.4. 5-(hexylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril



ozna ení	MK-4
sumární vzorec	$C_{13}H_{17}N_5$
molekulová hmotnost [g/mol]	243,3
výt žek	131,5 mg (65,68 %)
teplota tání [°C]	95 - 97
R_f	0,59
elementární analýza	vypo teno: C 64,17 %; H 7,04 %; N 28,78 % nam eno: C 64,25 %; H 7,25 %; N 28,86 %
1H NMR spektrum []	5.46 (1H, bs, NH), 3.62-3.45 (2H, m, CH_2), 2.46 (3H, s, CH_3), 1.78-1.54 (2H, m, CH_2), 1.45-1.19 (6H, m, CH_2), 0.89 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3)
^{13}C NMR spektrum []	152.7, 145.2, 130.8, 118.8, 114.7, 114.0, 41.8, 31.3, 28.7, 26.5, 22.5, 20.4, 13.9
I spektrum [cm^{-1}]	3377 (NH), 2929 (CH_3), 2856 (C_6H_{13}), 2365 (CN), 2226 (CN), 1580 (pyrazin), 1445 (NH), 1463, 1403, 1371, 1257 (pyrazin)

3.6.5. 5-methyl-6-(oktylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril



ozna ení	MK-5
sumární vzorec	$C_{15}H_{21}N_5$
molekulová hmotnost [g/mol]	271,4
výt žek	120,7 mg (60,1 %)
teplota tání [°C]	86 - 88
R_f	0,67
elementární analýza	vypo teno: C 66,39 %; H 7,80 %; N 25,81 % nam eno: C 66,64 %; H 7,92 %; N 25,84 %
1H NMR spektrum []	5.50 (1H, bs, NH), 3.58-3.45 (2H, m, CH_2), 2.45 (3H, s, CH_3), 1.73-1.56 (2H, m, CH_2), 1.45-1.18 (10H, m, CH_2), 0.87 (3H, t, $J=6.9$ Hz, CH_3)
^{13}C NMR spektrum []	152.7, 145.2, 130.9, 118.9, 114.7, 114.0, 41.8, 31.7, 29.2, 29.1, 28.8, 26.9, 22.6, 20.4, 14.0
I spektrum [cm^{-1}]	3399 (NH), 2916 (CH_3), 2851 (C_8H_{17}), 2360 (CN), 2230 (CN), 1580 (pyrazin), 1546 (NH), 1397, 1368, 1205 (pyrazin)

4. Biologické hodnocení

4.1. Výsledky antimykobakteriálního hodnocení:

Testování antituberkulotické aktivity nov syntetizovaných derivát pyrazinu prováděla MUDr. Michaela Svobodová z Oddělení klinické mikrobiologie Pardubické krajské nemocnice, a.s.

Látky byly testovány *in vitro* na účinnost proti *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. tuberculosis* I (divoký kmen), *M. kansasii* PKG 8, *M. avium* No. 80/72 a *M. avium* 152/73 na tekuté Šulovské ovací metodou ve srovnání s pyrazinamidem při pH 5,6. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu v koncentracích 200, 100, 50, 25, 12,5, 6 a 3 µg/ml. Výsledky byly odečítány po dvou a třech týdnech. Aktivita PZA se liší *in vitro* v závislosti na kyselosti prostředí, na jejím složení i velikosti inokula. Hodnoty MIC pro PZA (pyrazinamid) se v literatuře pohybují v rozmezí od 6,25 do 50 µg/ml.^{26,27,28}

Výsledky antimykobakteriálního testování:

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC (mg/l)					
	MK-1	MK-2	MK-3	MK-4	MK-5	PZA
<i>M. tuberculosis</i> <i>H₃₇Rv</i>	128	32	16	8	8	32
<i>M. tbc</i> I (divoký kmen)	128	32	16	16	16	32
<i>M. kansasii</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>M. avium</i> 80/72	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>M. avium</i> 152/73	>128	>128	>128	>128	>128	>128

Tab.3 výsledky antimykobakteriálního testování

4.2. Výsledky antifungálního hodnocení:

Nov syntetizované sloučeniny byly testovány in vitro na antifungální účinnost na KBLV FaF UK v Hradci Králové Mgr. Marcelou Vejsovou a paní Ildou Dufkovou. Testování probíhalo jako mikrodiluční bujónový test v destičkách. Testované látky byly dvojitě odněny, jako médium byl použit RPMI 1640¹ s glutaminem, který byl pufovan na pH 7,0 pomocí 0,167 M MOPS². MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách inkubace s výjimkou kmenu *Trichophyton mentagrophytes*, u kterého odečet nastal po 72 a 120 hodinách. Inkubace probíhala staticky, ve tmě a za humidní atmosféry při teplotě 35 °C. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně i fotometricky. Za MIC byla považována 80% inhibice kontroly (IC₈₀).²⁹

Výsledky antifungálního testování:

Testované kmeny (kód, číslo)	
<i>Candida albicans</i> ATCC 44859 CA	<i>Trichosporon beigeli</i> 1188 TB
<i>Candida tropicalis</i> 156 CT	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231 AF
<i>Candida krusei</i> E28 CK	<i>Absida corymbifera</i> 272 AC
<i>Candida glabrata</i> 20/l CG	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445 TM

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol/l)						
		MK-1	MK-2	MK-3	MK-4	MK-5	flukonazol	amfotericin B
CA	24h	250	125	62,5	62,5	125	0,25	0,016
	48h	>500	>500	500	>500	>250	0,5	0,063
CT	24h	62,5	250	62,5	62,5	3,9	0,5	0,063
	48h	250	500	250	>500	31,25	>128	0,063
CK	24h	125	250	125	62,5	15,62	16	0,125
	48h	250	500	125	125	15,62	32	0,125
CG	24h	>500	>500	500	>500	125	4	0,031
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	16	0,125
TB	24h	>500	>500	250	>500	>250	1	1
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	2	2
AF	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>128	0,125
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>128	0,25
AC	24h	>500	>500	>500	>500	>250	>128	1
	48h	>500	>500	>500	>500	>250	>128	2
TM	72h	250	500	62,5	15,62	1,95	8	1
	120h	250	500	62,5	15,62	1,95	16	1

Tab.4 Výsledky antifungálního testování

¹ RPMI 1640 – zkratka z angl. Rockwell Park Memorial Institute

² MOPS – systematický název: 3-(morfolino)propansulfonová kyselina

4.3. Výsledky antibakteriálního hodnocení:

Nově syntetizované sloučeniny byly testovány in vitro na antibakteriální účinnost na katedře biologických a lékařských věd (KBLV) FaF UK v Hradci Králové Mgr. Marcelou Vejsovou a paní Idou Dufkovou. Testování probíhalo jako mikrodiluční bujónový test v destičkách – M27A-M1. Jako médium zvolen Mueller-Hinton v bujón. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace. Inkubace probíhala staticky, ve tmě a za humidní atmosféry při teplotě 35 °C. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně i fotometricky. Za MIC byla považována 80% inhibice kontroly (IC₈₀).²³

Sloučeniny byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), antibakteriální aktivita byla určena v Mueller-Hintonovém bujónu, který byl pufovaný na pH 7,0. Kontrola se skládala z média a samotného DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřesáhla 1 % (v/v) v celkovém složení roztoku.

Testované kmeny byli zajištěny z České sbírky mikroorganismů (Brno, ČR): *Staphylococcus aureus* CCM 4516/08 – **SA**, *Escherichia coli* CCM 4517 – **EC**, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 – **PA**. Ostatní kmeny byly získány z klinických izolátů (Oddělení klinické mikrobiologie, Univerzitní nemocnice a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, ČR): *Staphylococcus aureus* H 5996/08 – methicilin rezistentní – **MRSA**, *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08 – **SE**, *Enterococcus sp.* J 14365/08 – **EF**, *Klebsiella pneumoniae* D11750/08 – **KP**, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 – ESBL pozitivní – **KP-E**.

Výsledky antibakteriálního testování:

Testované kmeny (kód, číslo)		Název antibiotika
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516/08 SA	<i>Escherichia coli</i> CCM 4517 EC	Neomycini sulfas
<i>Staphylococcus aureus</i> H 5996/08 Methicilin rezistentní MRSA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> D 11750/08 KP	Bacitracin zinc.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> H 6966/08 SE	<i>Klebsiella pneumoniae</i> J 14368/08 ESBL pozitivní KP-E	Penicilin G
<i>Enterococcus sp.</i> J 14365/08 EF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM	Ciprofloxacin HCC
		Phenoxymethylpenicilin

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol/l)									
		MK-1	MK-2	MK-3	MK-4	MK-5	Neom	Bac	Pen	Cipr	Phen
SA	24h	500	>500	>500	125	15,62	3,9	15,62	0,24	0,98	0,24
	48h	500	>500	>500	125	31,25	3,9	31,25	0,24	0,98	0,24
MRSA	24h	500	>500	>500	125	125	0,98	15,62	125	500	250
	48h	500	>500	>500	500	125	0,98	31,25	125	500	500
SE	24h	>500	250	250	500	250	3,9	15,62	31,25	250	62,5
	48h	>500	>500	>500	>500	250	7,81	31,25	125	250	250
EF	24h	>500	500	500	500	>500	250	31,25	7,81	0,98	7,81
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	250	31,25	15,62	0,98	7,81
EC	24h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	125	0,06	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	125	0,06	>500
KP	24h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	250	0,12	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	250	0,12	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	0,98	>500	>500	>500	>500
PA	24h	>500	>500	>500	>500	>500	7,81	>500	>500	3,9	>500
	48h	>500	>500	>500	>500	>500	15,62	>500	>500	7,81	>500

Tab.5 Výsledky antibakteriálního testování

5. Diskuze

V této rigorózní práci jsem se zaměřil na syntézu látek, které vznikly animodehalogenací reakcí. Na KFCHKL byla již dříve připravena pro mě potěbu výchozí látka³, která měla vcelku uspokojivé antimykotické působení. Navázáním alkylových etzů přes *-NH-* skupinu jsme chtěli zjistit, zda si dané látky zachovají svoji aktivitu. Rovněž nás zajímalo, zda dané látky nebudou mít antituberkulotickou aktivitu. Jistým bonusem byly výsledky antibakteriálního působení.

Z výsledků antifungálních testů výchozí látky (viz. kapitola Přílohy, Tab.6) vyplynulo, že substituce alkylovými etzami antifungální účinnost snížila. Z antibakteriálního testování výchozí látky (viz. kapitola Přílohy, Tab.7) se ukázalo, že substituce alkylem zvýšila účinnost derivátů 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, zvláště nejvíce lipofilního derivátu MK-5.

Celkem bylo připraveno 5 látek, u kterých se postranní etz analogicky rozšiřoval. Výsledné produkty byly připraveny reakcí 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s příslušným primárním alifatickým aminem.

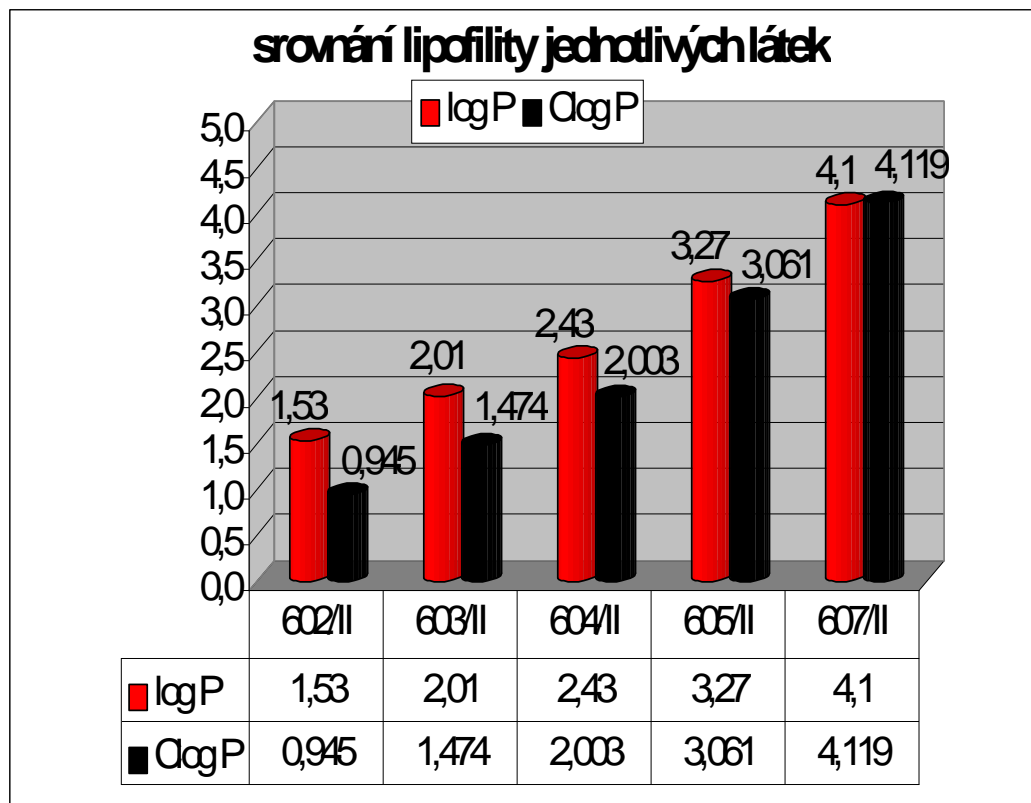
Reakce probíhaly standardně, jen drobnou komplikací byla syntéza 5-(ethylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Tato komplikace se týkala teploty varu výchozího ethylaminu, která je pouze 15 °C. Výtěžky reakcí se pohybovaly od 60,1 % do 73,26 %.

Finální látky byly charakterizovány teplotou tání, R_f (u finálních sloučenin je uvedena hodnota rozdělovacího koeficientu v soustavě hexan:ethyl-acetát 1:1), elementární analýzou, ^1H a ^{13}C NMR a IR spektry. Ukázky těchto spekter jsou přiloženy v kapitole Přílohy a jejich interpretace je zaznamenána v tabulce u příslušné finální sloučeniny.

Dalším parametrem syntetizovaných látek byla jejich lipofilita. Byla vyhodnocována pomocí programu CS ChemOffice Ultra ver. 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Přímě zjišťovanými parametry byl: $\log P$ a $\text{Clog } P$ (viz graf 1). Hodnoty stoupaly u obou parametrů s molekulovou hmotností, to souvisí s prodlužujícím se postranním etzům. Konkrétní hodnoty se pohybovaly od 1,53

³ 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril

do 4,1 pro log *P* a od 0.945227 do 4.11923 u Clog *P* (viz graf 1). Soudí se, že míra lipofility je rozhodující pro pr ník p es vysoce lipofilní mykobakteriální st nu.



graf 1: srovnání lipofility jednotlivých látek

Všechny látky byly podrobeny *in vitro* testování na jejich biologickou aktivitu. Jednalo se o antimykobakteriální, antimykotickou a antibakteriální testování.

Co se týče antimykobakteriální aktivity (viz Tab.3), můžeme říci, že aktivita rostla v pořadí od nejnižší k nejvyšší hodnotě lipofility daných derivátů. Při daném pH tedy, které ovlivňuje účinnost PZA, byly látky s vyšší lipofilitou (MK-3, MK-4, MK-5) účinnější. Lze to vysvětlit tím, že se vzrůstající lipofilitou sloučeniny snadněji penetrují již známou lipofilní buněčnou stěnou mykobakterií. Proto je u potenciálně účinných látek proti tuberkulóze velmi důležitým parametrem právě lipofilita.

K výsledkům antifungálních testů (viz Tab.4) můžeme říci, že nejvyšší aktivitu vykazovala látka MK-5 a to především proti kmenu *Trichophyton mentagrophytes*, k druhému v pořadí nejcitlivějšímu kmeni patří kmen *Candida tropicalis* a *Candida krusei*. Za zmínku snad stojí aktivita látky MK-4 proti již uvedenému kmenu

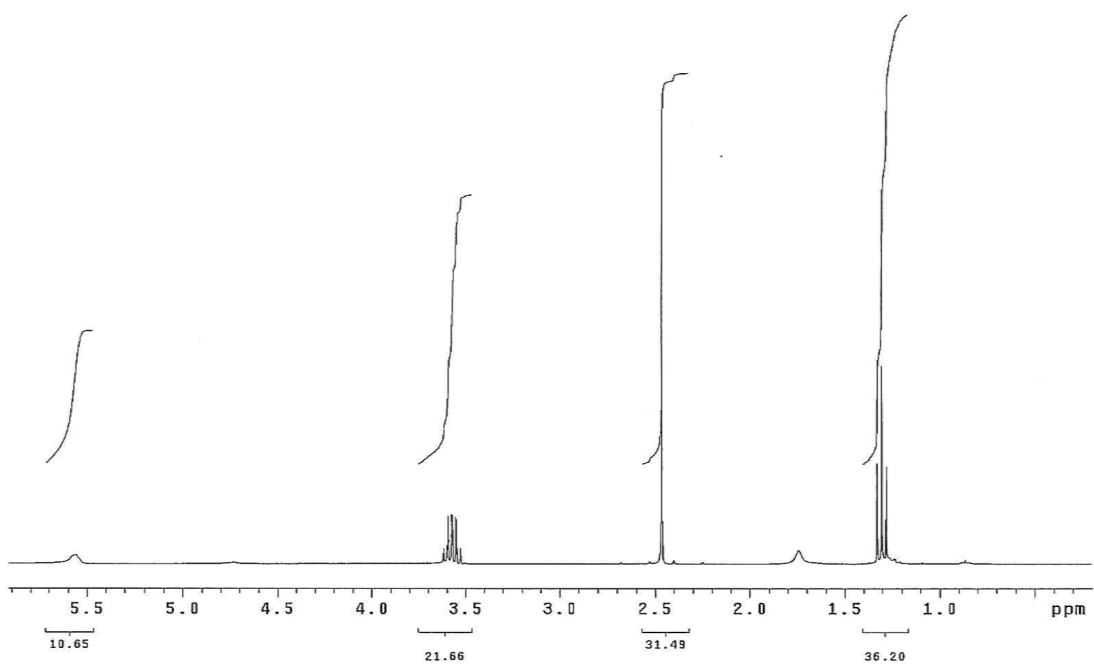
Trichophyton mentagrophytes. Ostatní látky vykazovaly slabou antimykotickou účinnost. V porovnání s již používanými antimykotiky se aktivita látky MK-5 blížila aktivitě amfotericinu B proti kmeni *Trichophyton mentagrophytes* a flukonazolu proti *Candida krusei*. Látka MK-4 se blížila flukonazolu proti *Trichophyton mentagrophytes*.

Poslední zkoumanou aktivitou byla antibakteriální aktivita (viz Tab.5) Všechny látky měly slabou až velmi slabou antibakteriální účinnost. Za zmínku může stát aktivita látky MK-5 proti *Staphylococcus aureus*, tato aktivita je srovnatelná s aktivitou antibiotika bacitracinu, které ovšem ve srovnání s ostatními testovanými antibiotiky vykazuje proti tomuto kmeni nejnižší aktivitu.

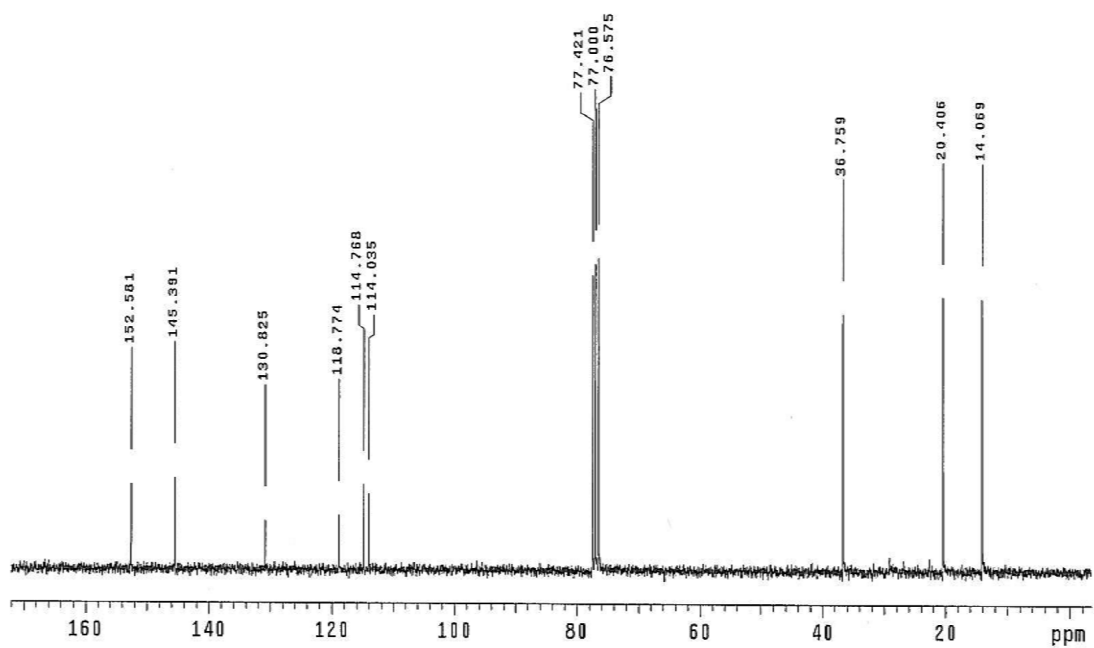
6. P ílohy

6.1. Spektra finálních sloučenin

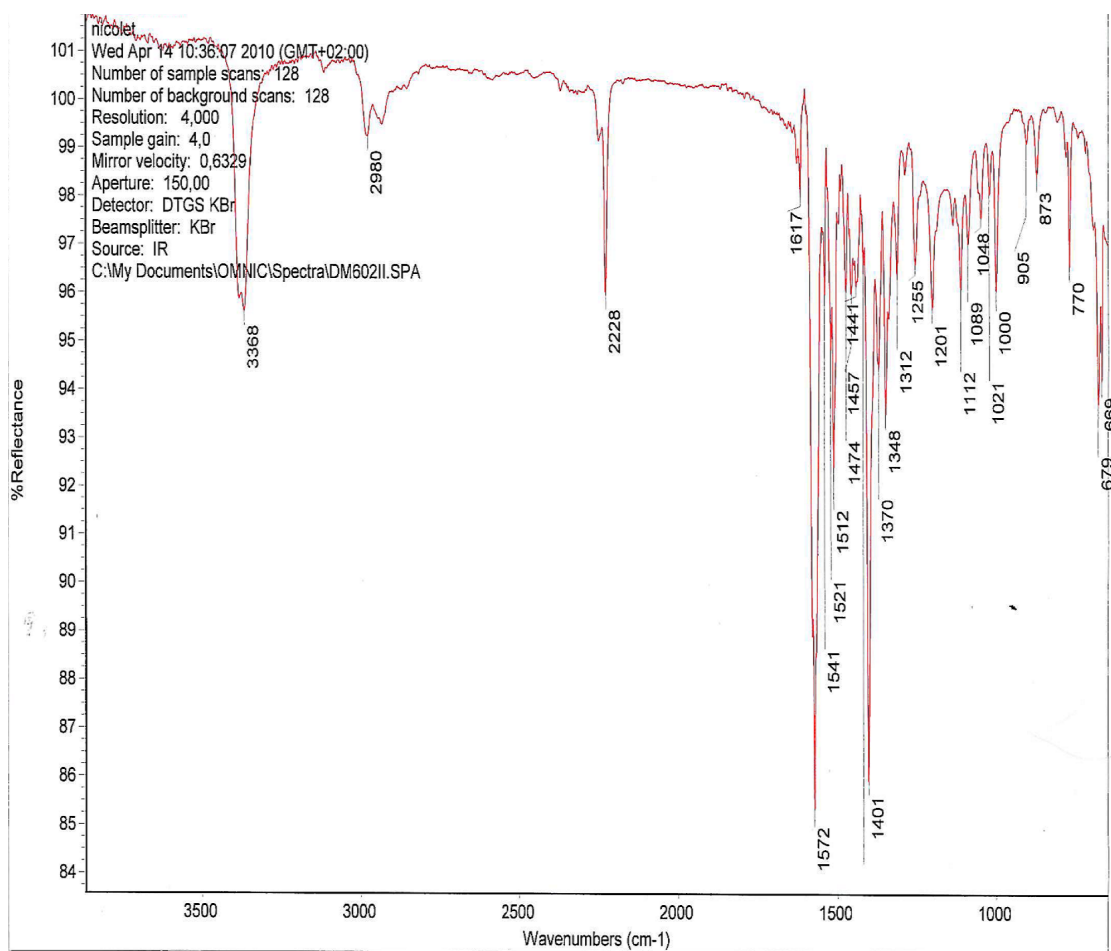
6.1.1. MK-1



¹H NMR spektrum

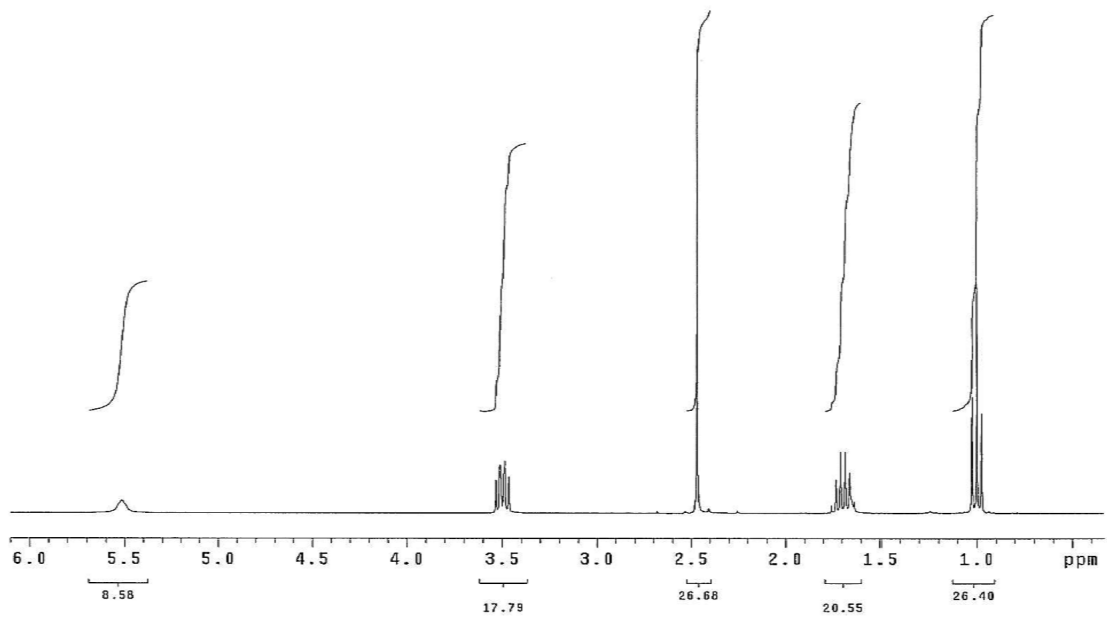


¹³C NMR spektrum

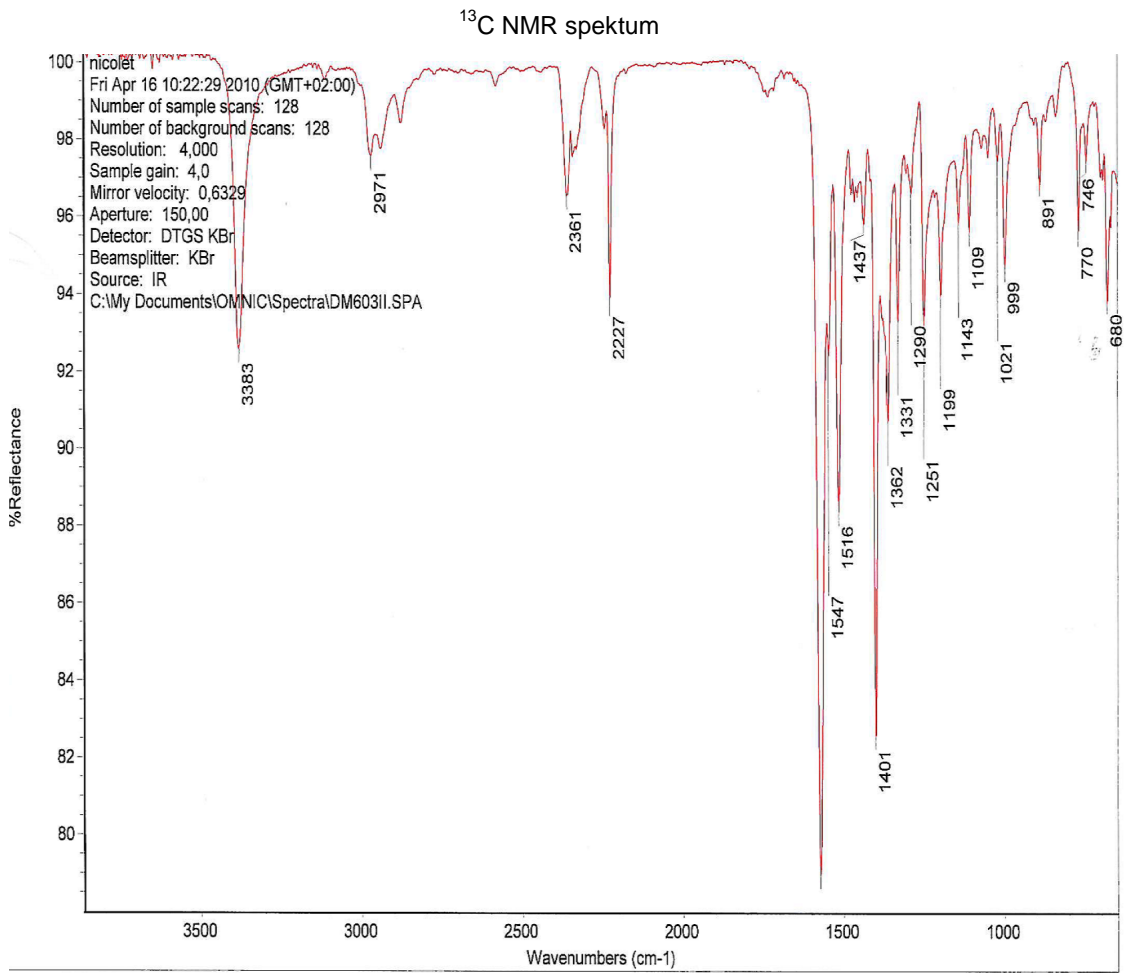
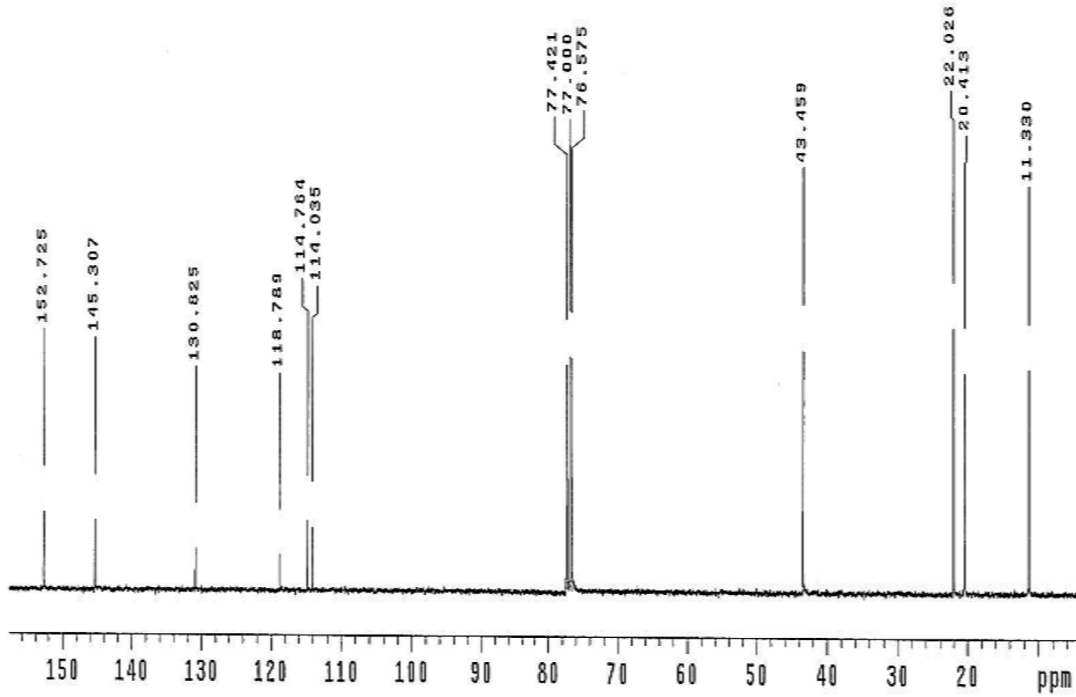


I spektrum

6.1.2. MK-2

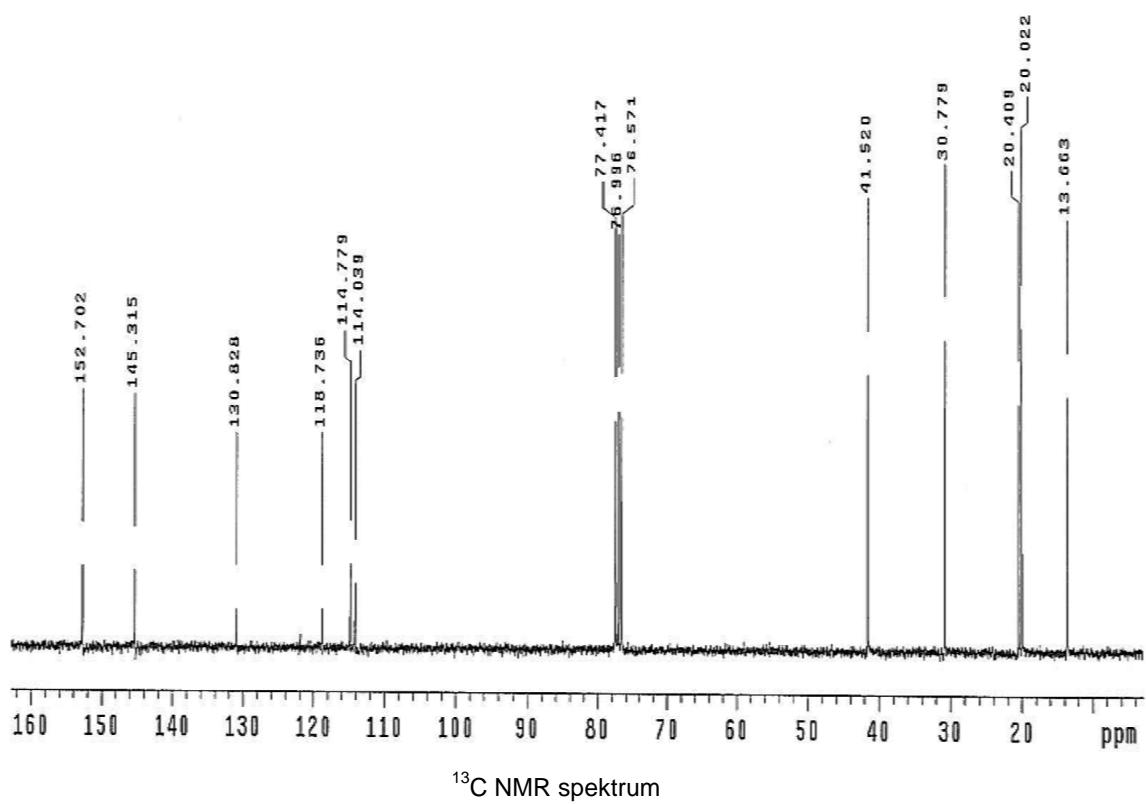
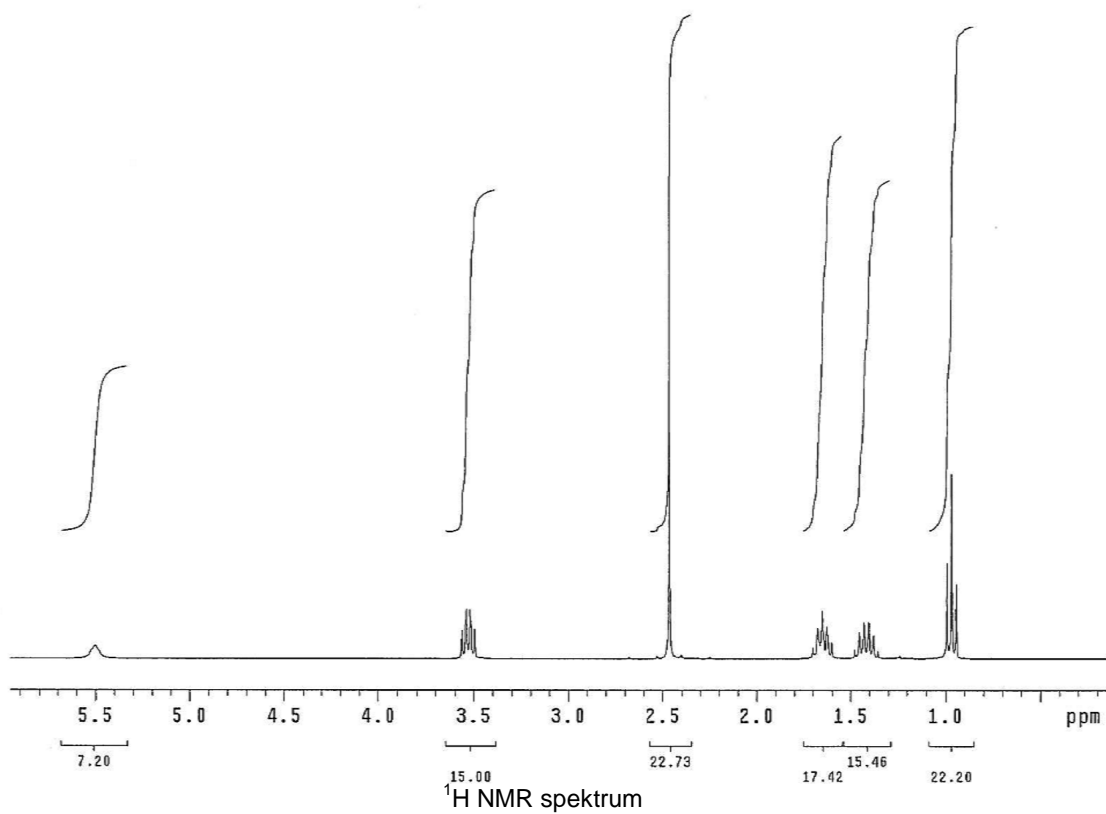


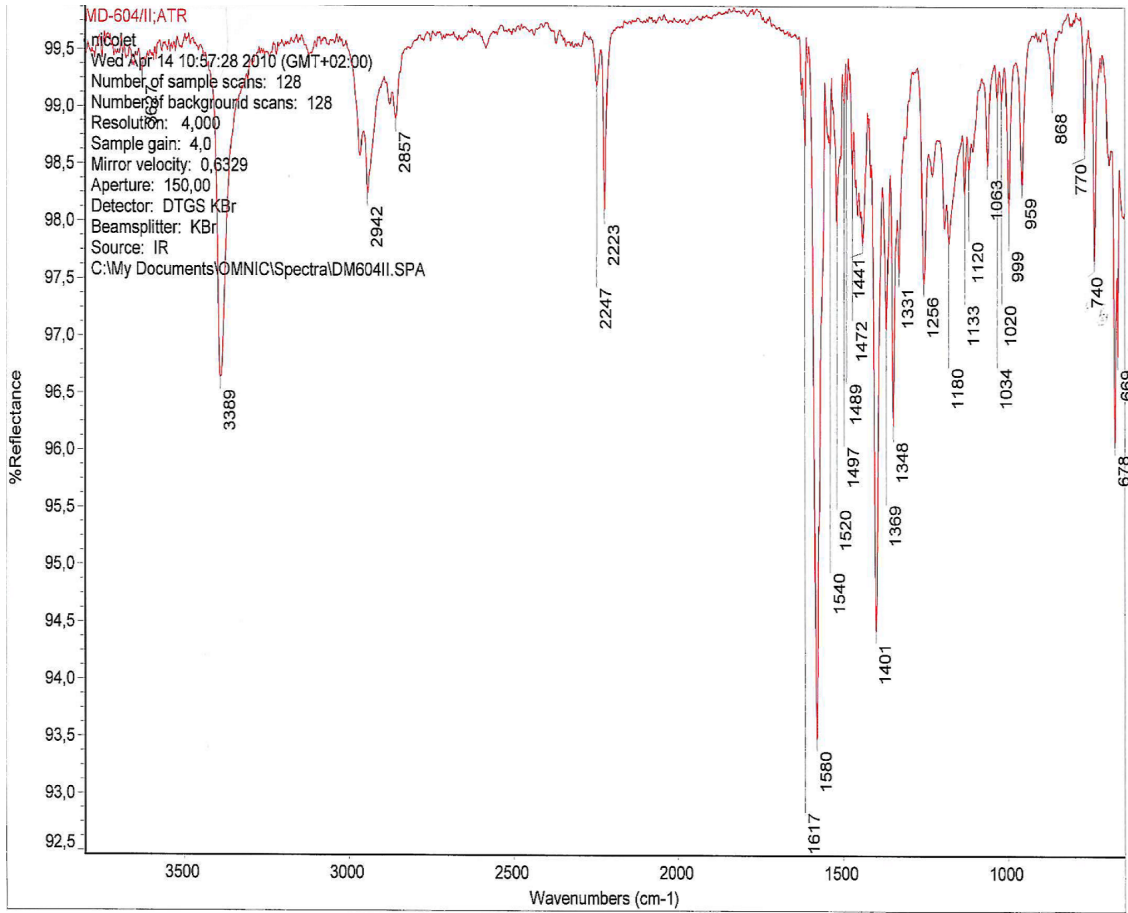
¹H NMR spektrum



I spektrum

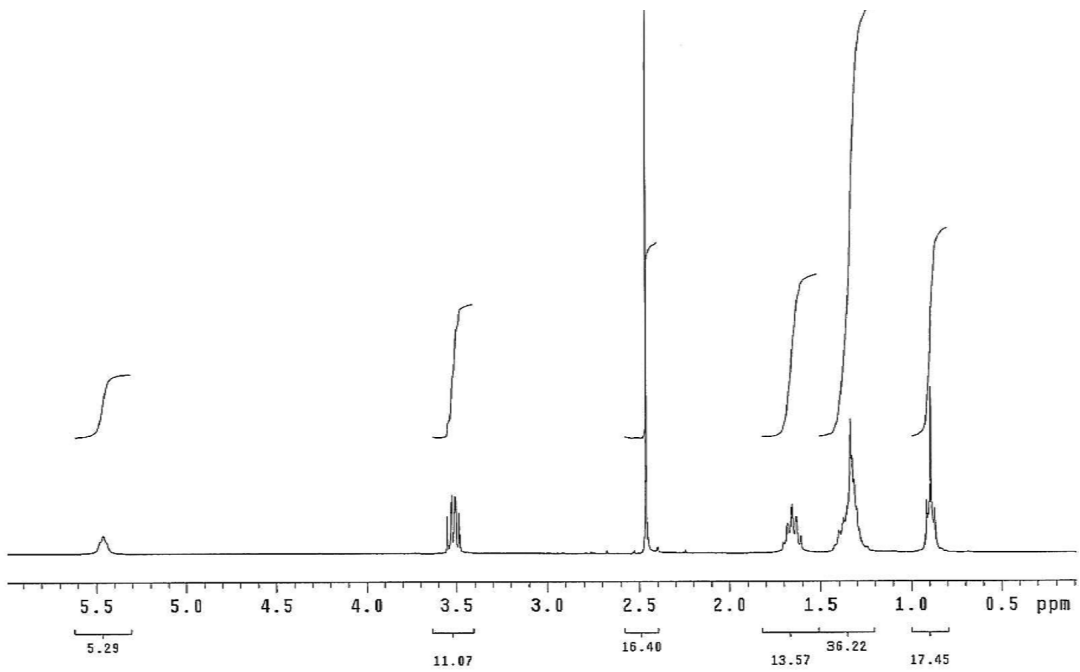
6.1.3. MK-3



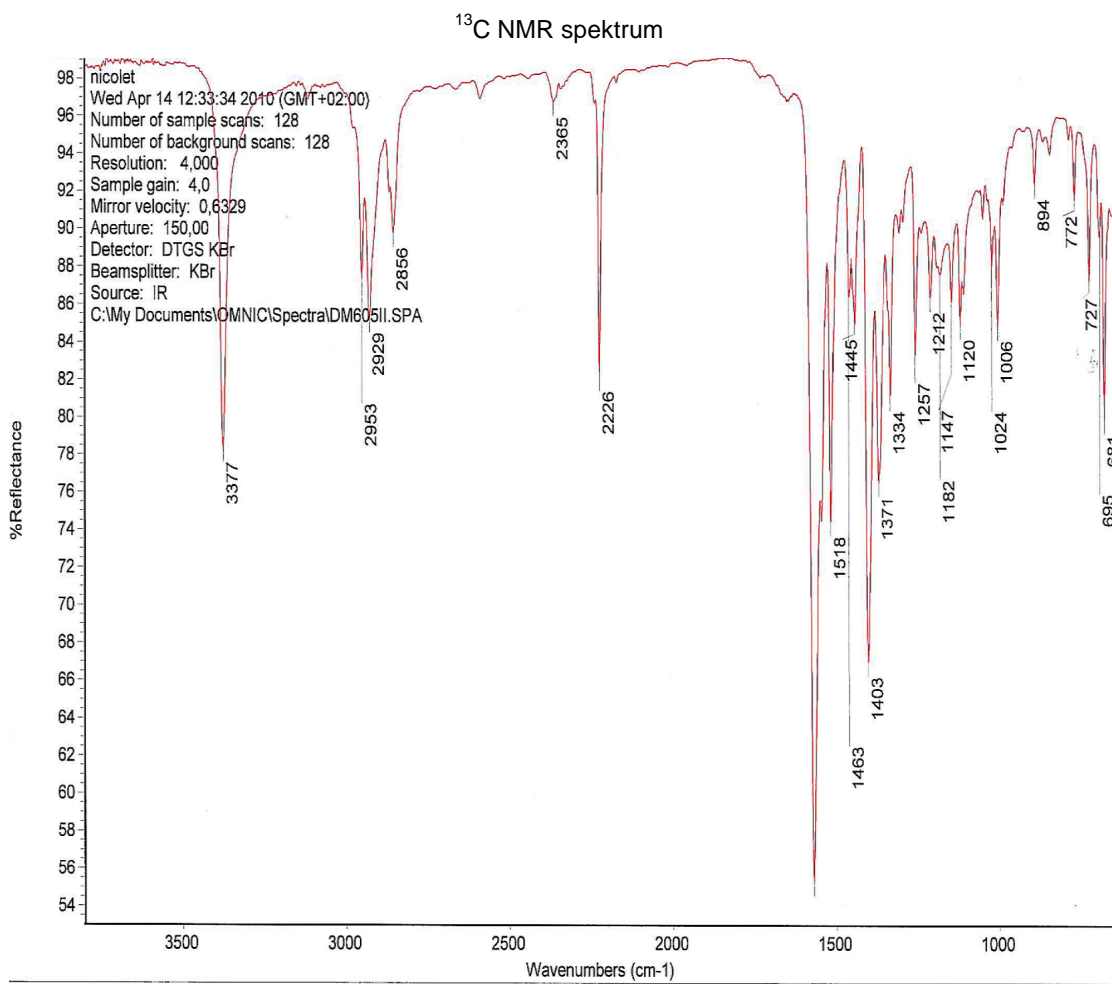
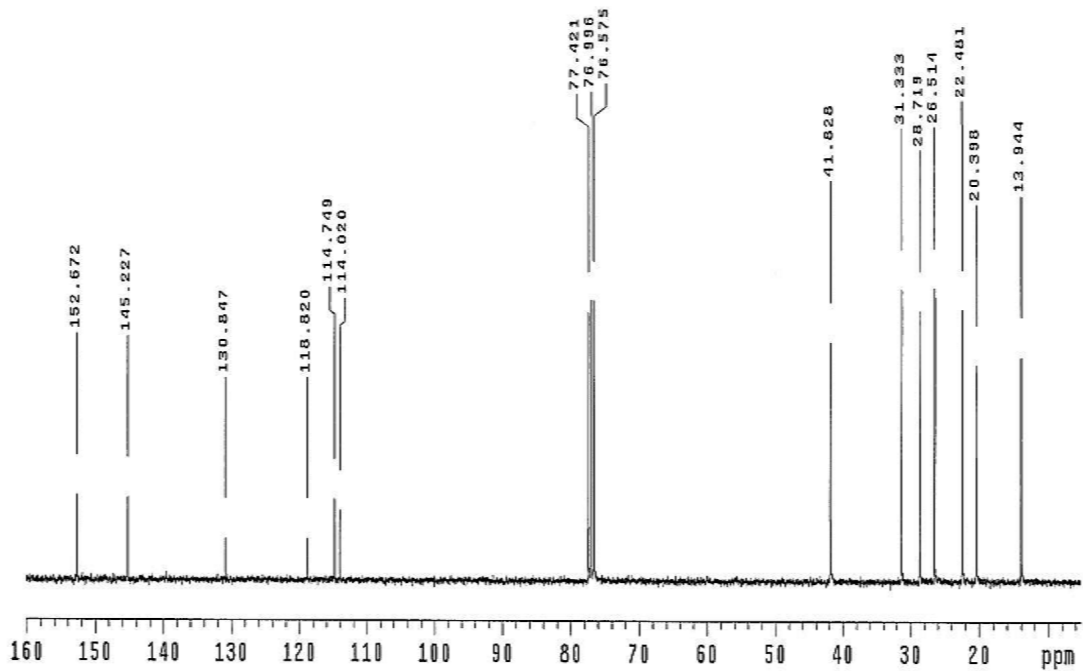


I spektrum

6.1.4. MK-4

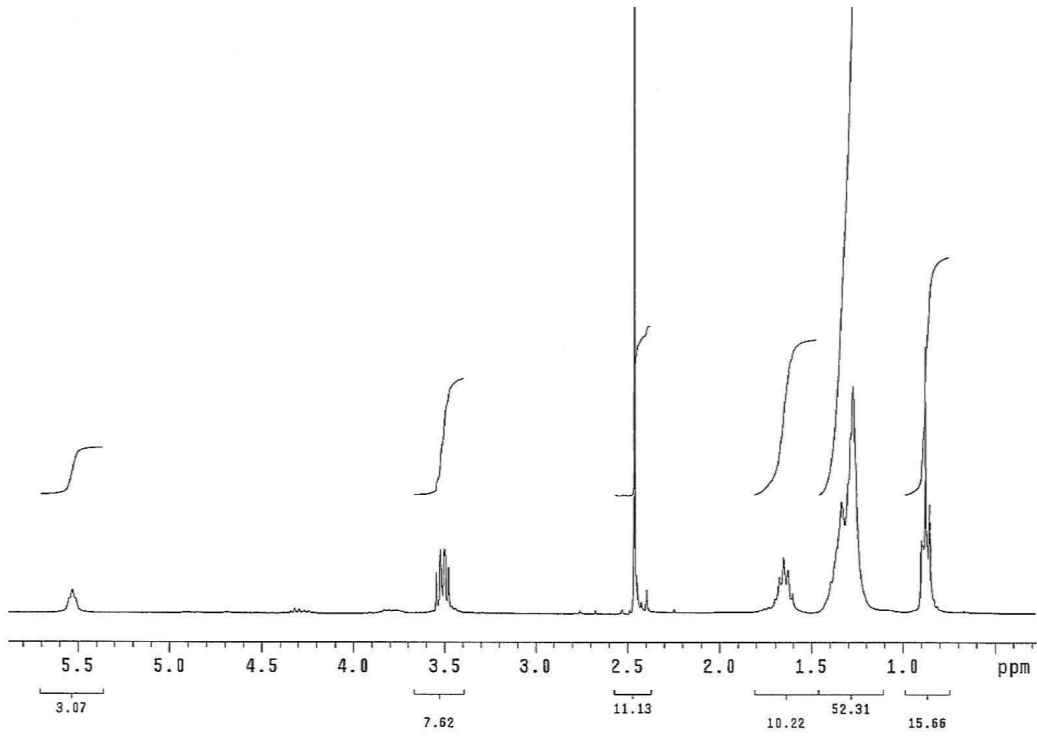


¹H NMR spektrum

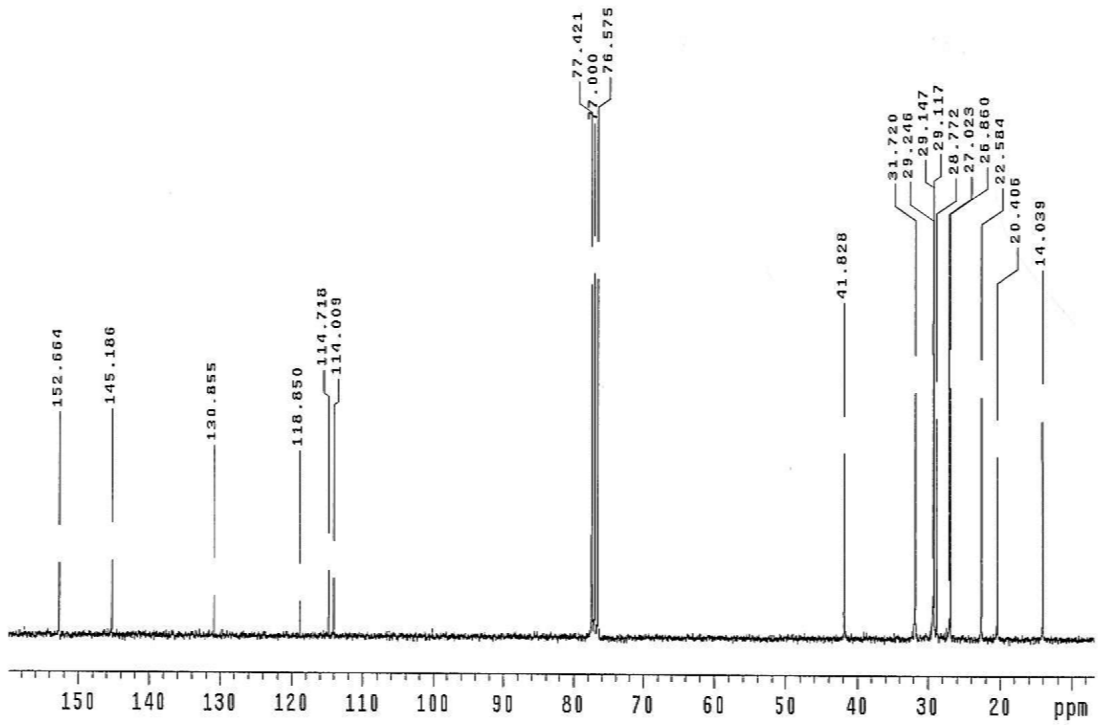


I spektrum

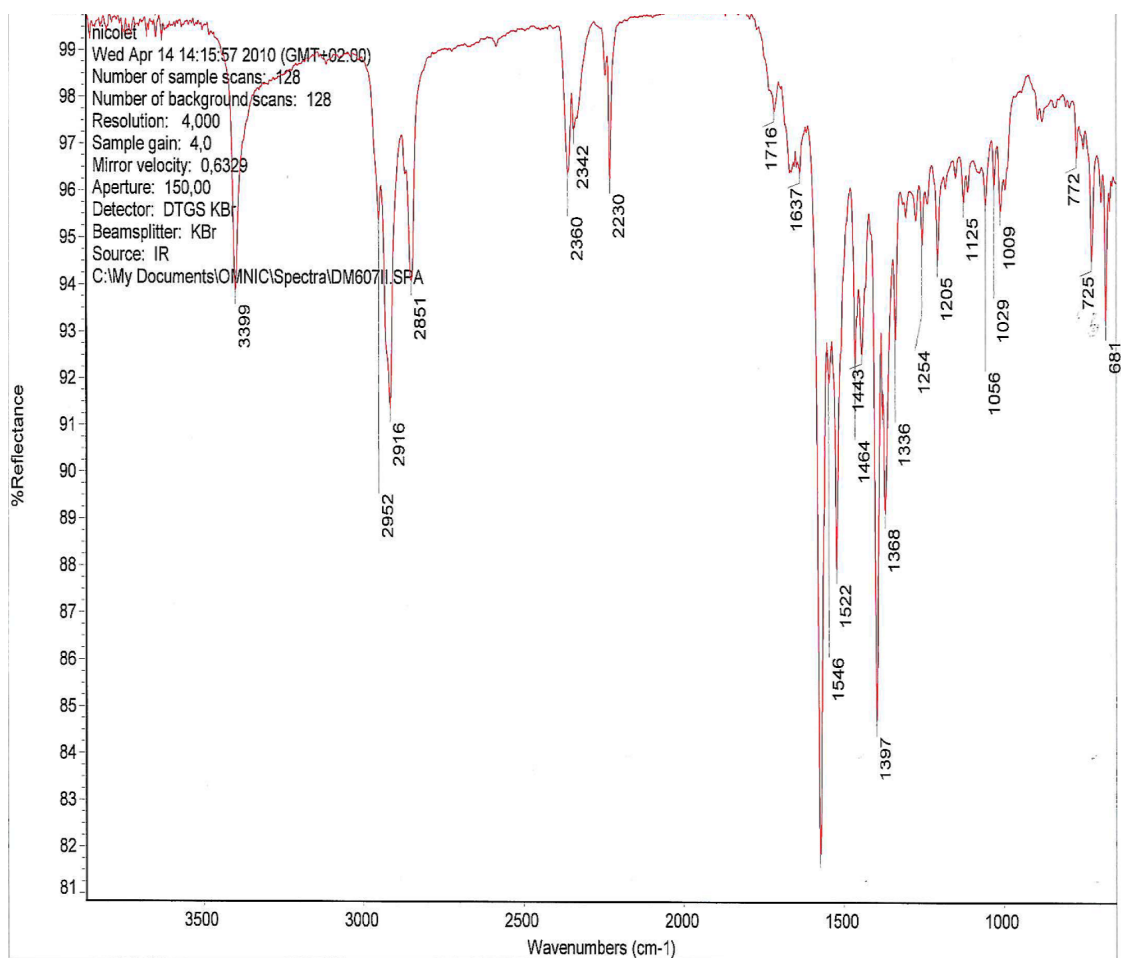
6.1.5. MK-5



¹H NMR spektrum



¹³C NMR spektrum



I spektrum

6.2. Výsledky antifungálních a antibakteriálních test 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol/l)	
	5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	
CA	24h	1,95
	48h	15,62
CT	24h	15,62
	48h	62,5
CK	24h	3,9
	48h	3,9
CG	24h	15,62
	48h	62,5
TB	24h	15,62
	48h	31,25
AF	24h	3,9
	48h	7,81
AC	24h	15,62
	48h	15,62
TM	72h	3,9
	120h	3,9

Tab.6 Výsledky antifungálních test 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

KMEN (kód)	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) - MIC/IC ₈₀ (μmol/l)	
	5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril	
SA	24h	500
	48h	>500
MRSA	24h	500
	48h	>500
SE	24h	500
	48h	>500
EF	24h	500
	48h	>500
EC	24h	500
	48h	>500
KP	24h	500
	48h	>500
KP-E	24h	>500
	48h	>500
PA	24h	125
	48h	250

Tab.7 Výsledky antibakteriálních test 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

7. Závěr

V rámci této rigorózní práce jsem splnil následující cíle:

- S použitím dostupné odborné literatury jsem provedl rešerši zaměřenou na současný výskyt tuberkulózy a možnosti její léčby.
- Připravil jsem následující v literatuře nepopsané sloučeniny:
 1. 5-(ethylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
 2. 5-methyl-6-(propylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
 3. 5-(butylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
 4. 5-(hexylamino)-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
 5. 5-methyl-6-(oktylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- Výše uvedené produkty jsou charakterizovány teplotou tání, R_f , elementární analýzou, ^1H a ^{13}C NMR a IR spektry.
- Všechny látky byly podrobeny *in vitro* biologickému testování, konkrétně bylo provedeno antimykobakteriální, antifungální a antibakteriální testování. Konkrétní hodnoty MIC viz. kapitola Biologické hodnocení a Diskuze.
- U látek bylo vypočteno a graficky zpracováno $\log P$ a $\text{Clog } P$ nových látek. Bližší informace lze nalézt v Diskuzi. Tento parametr se ukázal jako velmi podstatný u antituberkulotického testování, resp. účinnosti nových látek.

8. Seznam použité literatury

- ¹ Pratt, Y.T.: The Pyrazines and Piperazines. Elderfield R. C.: *Heterocyclic compounds. J. Wiley & Sons, New York, 1957, Vol. 6., s. 377.*
- ² Doležal, M. Biologicky aktivní pyraziny p írodního a syntetického p vodu. *Chem. Listy*, 2006, 100, s. 959 – 966.
- ³ Požarskij, A., F. *Chim. Geterocikl. Sordin.*, 1987, 7, s. 867.
- ⁴ <http://www.economy-point.org/p/pyrazin.html>, staženo 13.3.2009.
- ⁵ Connoly, M.A.; Chaulet, P.; Raviglione, M.C. Epidemiology of Tuberculosis. *Eur Respir Mon*, 1997, 4, s. 51 – 67.
- ⁶ <http://www.lekari-bez-hranic.cz/cz/downloads/TBC.pdf>, staženo 1.3.2010
- ⁷ Solutio, *Tuberkulóza*. [online], Solutio 2000/2001, [cit. 1.3.2010], dostupné na <http://www.medon-solutio.cz>
- ⁸ Bárt , V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Med*, 2007, 9, s. 372 – 373.
- ⁹ Bárt V. Tuberkulóza-infek ní choroba v 21. století. *Med. Pro Praxi*, 2008, 5(6), s. 245 – 248.
- ¹⁰ Hrdina, R. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, p ednáška z farmakologie II Antimykobakteriální látk y (Antituberkulotika. Antileprotika), 2008.
- ¹¹ Maher, D.; Chaulet, P.; Spinaci, S.; Harries, A. Treatment of tuberculosis. *Guidelines for national programmes WHO /TB/ 97.220*, 1997, 77s.
- ¹² Trulanti, R., P., Tesa i, N., Dwivedi, N., Tiwari, V., K. Fighting T uberculosis: An Old Disease with New Challenge. *Medicinbal Research Reviews*, 2005, 25.
- ¹³ Kop iva, F. BCG o kování a jeho komplikace. *Pediatric pro praxi*, 2003, 3, s. 140.
- ¹⁴ Rajecová, E.; Solovi , I. Sú asný poh ad na otázky v lie b tuberkulózy. *Klin Farmakol Farm*, 2003, 1, s. 25 – 28.
- ¹⁵ Raviglione, M.C.; Smith, I.M. XDR tuberculosis – implications for global public health. *N Engl J Med*, 2007, 7, s. 656 – 659.
- ¹⁶ L Ilman, H.; Mohr, K.; Wehling M. Farmakologie a toxikologie. 1. eské vydání Praha: Grada Publishing 2002: 696 s.
- ¹⁷ Singh, P.; Mishra, A.K.; Malonia, S.K.; Chauhan, D.S.; Sharma, V.D.; Venkatesan, K.; Katoch, V.M. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in Mycobacteria. *J Commun Dis*. 2006, 38, s. 288-98.
- ¹⁸ Hrdina R., Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, p ednáška z farmakologie II Antimykobakteriální látk y (Antituberkulotika. Antileprotika). 2008
- ¹⁹ Xinlin, D.; Weiru, W.; Rosalind, K.; Hisao, Y.; Huy, N.; Su ng-Hou, K. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry*. 2001, 40, s. 14611 – 14172.
- ²⁰ Tomioka, H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Expert Opin. Drug Discov*. 2008, 3, s. 21 – 49.
- ²¹ Peer, H.G.; Van der Heijden, A. *Rec. Trav. Chim*. 1969, 88, s. 1335.
- ²² Reuben, G.; McLaughlin C., J.and K. 2,3-pyrazinedicarboxylic acid. *Organic Syntheses*. 1963, 4, s. 824.
- ²³ Foks, H.; Manowska, W. *Acta Pol. Pharm*. 1976, 33, s. 55.
- ²⁴ Haider, N.; Heinisch, G.; Moshuber, J. *Pharmazie*. 1994, 49, s. 575.
- ²⁵ Banks, C. K. *J.Am. Chem. Soc*. 1944, 66, s. 1 127.
- ²⁶ Nakamura, A.; Ataka, T.; Segawa, H.; Takeuchi, Y.; Takematsu, T. Structure -activity relationship of herbicidal 5-ethylamio- and 5-propylamino-2,3-dicyanopyrazines. *Agric. Biol. Chem.*, 1983, 47(7), s. 1561 – 1567.
- ²⁷ McDermott, W.; Tompsett R. *Am. Rev. Tuberc*. 1954, 70, s. 748.
- ²⁸ Markus, J. *Tubercle (Lond.)* 1964, 45, s. 47.
- ²⁹ Havel, A.; Moravek, J.; Sojková, M.; Urban ík, R. Sborník V. bakteriologického seminá e „Aktuální otázky bakteriologie tuberkulózy“. 1964, s. 28.
- ³⁰ Jones, R.N.; Barry, A.L. Optimal dilution susceptibility testing conditions, recommendations for MIC interpretation, and quality control guidelines for the ampicillin-sulbactam combination. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987, 25, s.1920-1925.