

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

# Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva II

Diplomová práce

2009

Michal Kašírek

**estné prohlášení:**

**Prohlašuji, 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 ádn citovány.**

**V Praze .....**

.....  
**podpis**

# Obsah:

<b>ESTNÉ PROHLÁŠENÍ:</b> .....	<b>- 2 -</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATK:</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>- 7 -</b>
3.1. PYRAZIN .....	- 7 -
3.1.1. <i>Obecné vlastnosti</i> .....	- 7 -
3.1.2. <i>Chemické vlastnosti</i> .....	- 7 -
3.1.3. <i>Zdroje pyrazin</i> .....	- 7 -
3.1.3.1. Přírodní pyraziny .....	- 7 -
3.1.3.2. Syntetické pyraziny .....	- 8 -
3.1.3.3. Léčiva s pyrazinem v molekule .....	- 8 -
3.1.4. <i>Vztah léčiva s pyrazinem v molekule k diplomové práci</i> .....	- 9 -
3.1.5. <i>Nově syntetizované pyrazinové deriváty</i> .....	- 10 -
3.1.5.1. Hydrazidové deriváty .....	- 10 -
3.1.5.2. Pyrazinamidové deriváty .....	- 10 -
3.1.5.3. Pyrazinové deriváty s odlišnými úhlníky .....	- 12 -
3.2.1. <i>Přírodní onemocnění, rizika, rizikové skupiny</i> .....	- 14 -
3.2.2. <i>Léčiva tbc</i> .....	- 15 -
3.2.2.1. Příehled léčiva proti tbc .....	- 15 -
3.2.2.2. Očkování .....	- 15 -
3.2.2.3. Léčebný program tbc .....	- 16 -
3.2.2.4. Rezistence na antituberkulóza .....	- 16 -
3.2.2.5. Nové sloučeniny vyvíjené k léčbě tbc .....	- 17 -
3.2.3. <i>Vzorce léčiva iv používaných k terapii tbc:</i> .....	- 18 -
3.2.3.1. Léčiva 1. ady: .....	- 18 -
3.2.3.2. Léčiva 2. ady: .....	- 18 -
3.3. MYKÓZY .....	- 21 -
3.3.1. <i>Přírodní mykóz</i> .....	- 21 -
3.3.2. <i>Rozdělení mykóz</i> .....	- 21 -
3.3.2.1. Povrchové mykózy .....	- 21 -
3.3.2.2. Systémové mykózy .....	- 22 -
3.3.3. <i>Příehled používaných látek</i> .....	- 22 -
3.3.3.1. Azolová chemoterapeutika .....	- 22 -
3.3.3.2. Polyenová antibiotika .....	- 22 -
3.3.3.3. Alkylaminy .....	- 23 -
3.3.3.4. Ciklopirox .....	- 23 -
3.3.3.5. Flucytosin .....	- 23 -
3.3.3.6. Griseofulvin .....	- 23 -
3.3.3.7. Echinokandiny .....	- 23 -
3.3.4. <i>Vzorce vybraných antimykotik :</i> .....	- 24 -
3.4. ANTIVIROTIKA .....	- 27 -
3.4.1. <i>Rozdělení antivirotik</i> .....	- 27 -
3.4.1.1. Látky blokující syntézu virové NK .....	- 27 -
3.4.1.2. Látky interferující s virovým metabolismem .....	- 27 -
3.4.1.3. Látky vstupující do vývojových stádií .....	- 28 -
3.4.2. T-705 .....	- 28 -
3.4.3. Flutimid .....	- 29 -
3.4.4. <i>Vzorce k části antivirotika:</i> .....	- 30 -
<b>4. METODICKÁ ČÁST</b> .....	<b>- 31 -</b>
4.1. PYRAZIN .....	- 31 -
4.1.1. <i>Obecné a fyzikální vlastnosti</i> .....	- 31 -
4.1.2. <i>Chemické vlastnosti</i> .....	- 31 -
4.1.3. <i>2-methoxy-3-methylpyrazin</i> .....	- 31 -
4.2. N-OXIDACE .....	- 32 -
4.2.1. <i>Vliv reakčních podmínek</i> .....	- 32 -
4.2.2. <i>Vliv substituentů na regiosektivitu oxidace</i> .....	- 32 -
4.3. CHLORACE .....	- 34 -
4.3.1. <i>Význam a získání halogenderivátů</i> .....	- 34 -
4.3.2. <i>Podmínky a vliv substituentů na chloraci</i> .....	- 34 -

4.4. AMINODEHALOGENACE .....	- 36 -
4.4.1. <i>Vliv substituent na proveditelnost dehalogenací reakce</i> .....	- 36 -
4.4.1.1. Substituce anilinu .....	- 36 -
4.4.1.2. Substituce pyrazinového jádra .....	- 36 -
4.5. METODIKA TESTOVÁNÍ .....	- 37 -
4.5.1. <i>Antifungální testování</i> .....	- 37 -
4.5.2. <i>Antibakteriální testování</i> .....	- 37 -
4.5.3. <i>Antivirotické testování</i> .....	- 38 -
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ÁST</b> .....	<b>- 39 -</b>
5.1. POPIS A CHARAKTERIZACE JEDNOTLIVÝCH LÁTEK .....	- 39 -
5.1.1. <i>Pístroje a chemikálie</i> .....	- 39 -
5.1.2. <i>Praktické provedení jednotlivých reakcí</i> .....	- 39 -
5.1.2.1. <i>N-oxidace</i> .....	- 39 -
5.1.2.2. <i>Chlorace</i> .....	- 40 -
5.1.2.3. <i>Aminodehalogenace</i> .....	- 40 -
5.1.3. <i>Vzorce, názvy a stručný popis finálních sloučenin</i> .....	- 41 -
5.1.3.1. <i>6-methoxy-5-methyl-N-fenylpyrazin-2-amin</i> .....	- 41 -
5.1.3.2. <i>N-(3-bromfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin</i> .....	- 42 -
5.1.3.3. <i>N-(3-jod-4-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin</i> .....	- 43 -
5.1.3.4. <i>N-(5-brom-4-fluor-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin</i> .....	- 43 -
5.1.3.5. <i>2,6-dibromo-4-(6-methoxy-5-methylpyrazin-2-ylamino)fenol</i> .....	- 44 -
5.1.3.6. <i>N-(5-fluoro-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin</i> .....	- 45 -
5.1.3.7. <i>N-(3-ethynylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin</i> .....	- 46 -
5.1.4. <i>Tabulková část popisující vlastnosti jednotlivých látek</i> .....	- 47 -
5.2. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ LÁTEK .....	- 49 -
5.2.1. <i>Antifungální hodnocení</i> .....	- 49 -
5.2.1.1. <i>Výsledky antifungálních testů</i> .....	- 49 -
5.2.2. <i>Antibakteriální hodnocení</i> .....	- 50 -
5.2.2.1. <i>Výsledky antibakteriálních testů</i> .....	- 50 -
5.2.3. <i>Antivirotické hodnocení</i> .....	- 51 -
5.2.3.1. <i>Výsledky antivirotických testů</i> .....	- 51 -
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>- 53 -</b>
6.1. SYNTÉZA .....	- 53 -
6.2. VLASTNOSTI LÁTEK .....	- 55 -
6.3. MECHANISMUS ÚČINKU .....	- 55 -
6.4. VÝSLEDKY BIOLOGICKÉHO HODNOCENÍ .....	- 56 -
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>- 59 -</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>- 60 -</b>

## Seznam použitých zkratk:

MDR-TB – „multi-drug resistant tuberculosis“	EtOH – ethanol
XDR-TB – „extensive-multidrug resistant tuberculosis“	DMSO – dimethylsulfoxid
tbc – tuberkulóza	To – toluen
<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>	Ac – aceton
<i>C. glabrata</i> – <i>Candida glabrata</i>	Hex – hexan
spp. – sub species	EtAc – ethylacetát
TD – test drug	CHCl <sub>3</sub> – chloroform
PZA – pyrazinamid	R <sub>f</sub> – reten ní faktor
<i>M. tuberculosis</i> – <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	POCl <sub>3</sub> – chlorid fosforýlu
<i>M. intracelulare</i> – <i>Mycobacterium intracelulare</i>	TLC – tenkovrstvá chromatografie
<i>M. avium</i> – <i>Mycobacterium avium</i>	NMR – nukleární magnetická rezonance
<i>M. kansasii</i> – <i>Mycobacterium kansasii</i>	IR – infra červená spektrometrie
<i>M. xenopi</i> – <i>Mycobacterium xenopi</i>	HPLC – vysokou inná kapalinová chromatografie
MIC – minimální inhibi ní koncentrace	UV – ultrafialová oblast sv telného spektra
WHO – Sv tová zdravotnická organizace	log <i>P</i> – logaritmus rozd lovacího koeficientu
CNS – centrální nervová soustava	log $\epsilon$ – logaritmus molárního absorp ního koeficientu
GIT – gastrointestinální trakt	$\lambda_{max}$ – vlnová délka v maximu
AT – antituberkulotika	IC <sub>80</sub> – 80% inhibice kontroly
BK – bakterie	OD – optická hustota
NÚ – nežádoucí ú inky	CC <sub>50</sub> – cytotoxicity concentration; koncentrace, kdy v 50% p ípad dojde k zaznamatelné poruše vývoje
NK – nukleová kyselina	EC <sub>50</sub> – effective concentration, koncentrace, p í které klesne patogenita viru na polovinu
DNA – deoxyribonukleová kyselina	CRFK – Crandel-Ress feline cells
RT – reverzní transkriptáza	MDCK – Madin Darby canine kidney cells
IC <sub>50</sub> – inhibi ní koncentrace, která usmrtí 50% populace	MCC – minimální cytotoxická koncentrace
pK <sub>a</sub> – disocia ní konstanta	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – peroxid vodíku	

# 1. Úvod

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léků se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potencionální antituberkulotickou a antimykotickou aktivitou. Tato diplomová práce je dílem píspvkem k tomuto výzkumu.

## 2. Cíl diplomové práce

Cílem diplomové práce má být syntéza, popis a zhodnocení účinnosti pyrazinových derivátů, které mají svůj základ v 2-methoxy-3-methylpyrazinu.

Tato práce by se měla skládat ze čtyř základních částí. Každá část se v níje problematice pyrazinových derivátů z jiného pohledu.

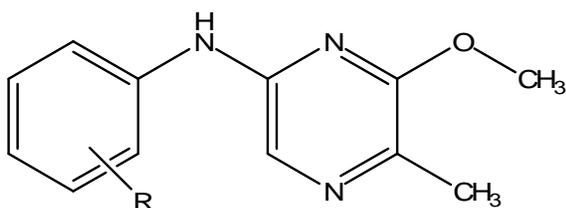
Obecná část se soustředí na obsáhnutí možných účinků budoucích sloučenin a to na základě strukturní podobnosti s již známými i nově objevenými, ale nad jinými sloučeninami. Dále se snaží podat informace o pyrazinu a obecně o pyrazinových derivátech.

Metodická část se v níje pohledu na prováděné reakce a na metodiku testování. Z odborného hlediska se snaží pojmut chemismus reakcí, a to především vliv reakčních podmínek, substituent jednotlivých složek na proveditelnost reakce, atd.

Experimentální část se zabývá již vlastními výsledky práce. Jednak zaznamenává praktický průběh reakcí a jejich podmínek, zabývá se popisem a vlastnostmi připravených sloučenin. Dále se v níje biologickému hodnocení nasyntetizovaných látek a následně se snaží rozebrat informace vyplývající z provedených biologických testů.

Diskuze komentuje průběhy syntéz, výťažnost reakcí, vlastnosti látek a zdrazuje důležité informace z nich vyplývající. Zabývá se možným mechanismem účinku. Dále reflektuje výsledky biologického hodnocení.

Celkově vzato výsledky této diplomové práce by měly odpovědět na otázku, do jaké míry je pro antimykobakteriální účinek pyrazinových derivátů nutná přítomnost karboxylové skupiny, resp. jejích funkčních derivátů (amid, thioamid, ester, nitril).



obecný vzorec připravovaných sloučenin

## 3. Teoretická část

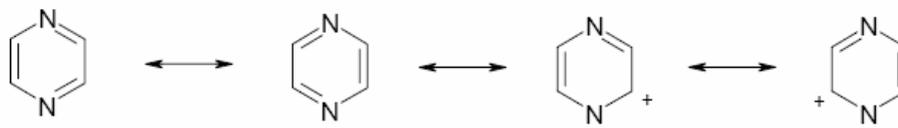
### 3.1. Pyrazin

#### 3.1.1. Obecné vlastnosti

Pyrazin je symetrická, slabě aromatická molekula, má planární charakter, je slabě bazický. Jeho vlastnosti jsou podobné terciálním alifatickým aminům. Chová se podobně jako slabá dvojsytná base<sup>1</sup>.

#### 3.1.2. Chemické vlastnosti

Co se týče chemických vlastností, nepodléhá elektrofilním substitucím (elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíku, a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje uhlíku heterocyklu), výhodnější jsou proto substituce nukleofilní<sup>2</sup>.



#### 3.1.3. Zdroje pyrazin

Deriváty pyrazinu jsou obsaženy v přírodních zdrojích, kde se vyskytují ve velmi malém množství a mají trpký charakter. Proto o jeho syntetické deriváty, které dnes plní mnoho různých funkcí a které mají předlohu právě v přírodních pyrazinových derivátech, začíná být zájem až v 70., 80. letech 20. století, kdy byla k dispozici taková technika, která byla schopná rozpoznat jejich strukturu.<sup>3</sup>

##### 3.1.3.1. Přírodní pyraziny

Přírodní látky plní funkci atraktantů, feromonů a signálních molekul u hmyzu a rostlin<sup>4</sup>. Přírodně vyskytující se pyraziny plní v potravě funkci vonidel a chutidel (to jsou zejména alkylované, vinylované, alkoxylované, alkylsulfanylové deriváty)<sup>4</sup>. Mechanismus tvorby pyrazinového jádra spoívá v autokondenzaci  $\alpha$ -aminokarbonylových sloučenin, příp. kondenzací  $\alpha$ ,  $\beta$ -dikarbonylových a  $\alpha$ ,  $\gamma$ -diaminosloučenin.<sup>4,5</sup>

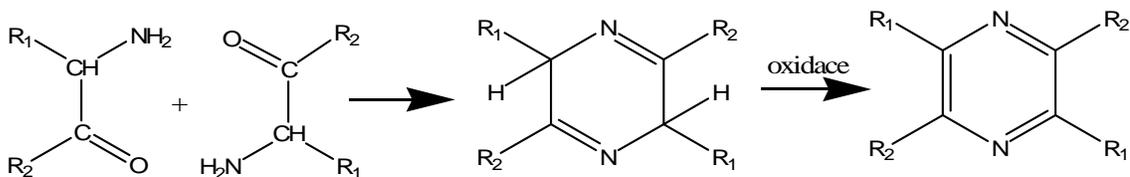


Schéma autokondenzace  $\alpha$ -aminokarbonylových sloučenin

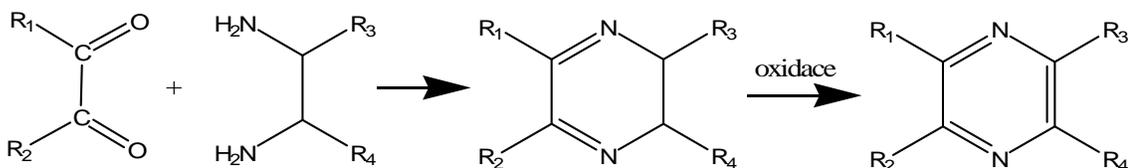


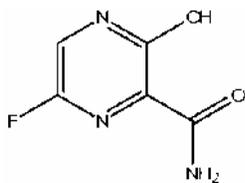
Schéma kondenzace  $\alpha$ ,  $\beta$ -dikarbonylových a  $\alpha$ ,  $\omega$ -diaminosloučenin

### 3.1.3.2. Syntetické pyraziny

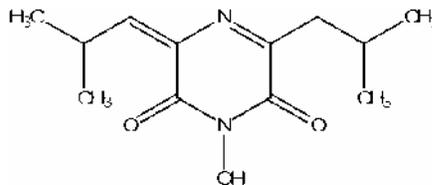
Syntetické deriváty pyrazinu jsou dnes využívány buď pro svoje charakteristické organoleptické vlastnosti a nebo mezi nimi můžeme najít i důležité i nadřazená léčiva. Co se týče jejich organoleptických vlastností, používají se především v potravinářském, tabákovém a veterinárním průmyslu. Spotřeba 3 nejpoužívanějších derivátů byla v roce 1995 v Evropě 1740 kg (2,3,5 trimethylpyrazin (840 kg); 2-ethyl-3-methylpyrazin (590 kg); 2-ethyl-3,(5 nebo 6)dimethylpyrazin (310 kg); v USA 1620 kg (2-acetylpyrazin (920 kg); 2,3,5 trimethylpyrazin (350 kg); 2,3,5,6 tetramethylpyrazin (140 kg). Z toho vyplývá, že spotřeba těchto látek na uvedených kontinentech a zemích je 120  $\mu$ g na osobu na den<sup>6</sup>.

### 3.1.3.3. Léčiva s pyrazinem v molekule

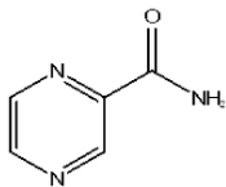
Mezi léčiva obsahující ve své molekule pyrazin můžeme jmenovat například tyto: amilorid (diuretikum), acipimox (hypolipidemikum), sulfapyrazin (sulfonamidové chemoterapeutikum), glipizid (antidiabetikum), flutimid (antivirotikum), T 705 (= 6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamid; nové nadřazené antivirotikum), pyrazinamid (antituberkulotikum).



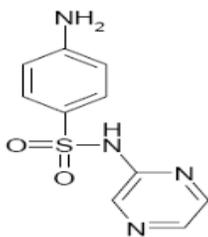
Obrázek 1 – T 705



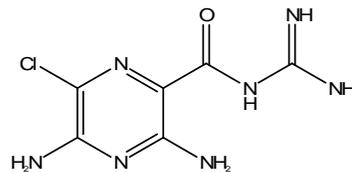
Obrázek 2 - flutimid



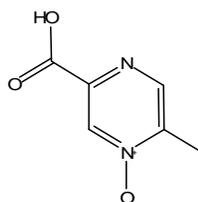
Obrázek 3 – pyrazinamid



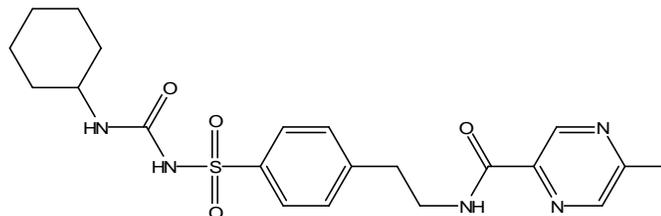
Obrázek 4 - sulfapyrazin



Obrázek 5 - amilorid



Obrázek 6 - acipimox



Obrázek 7 – glipizid

### 3.1.4. Vztah lé iv s pyrazinem v molekule k diplomové práci

U všech jmenovaných látek se jedná o léiva s poměrně malou molekulovou hmotností a jednoduchou strukturou. Tomu odpovídají i mnohá syntetizovaná molekuly. Lze také vidět, že rozptýlení pyrazinových derivátů je široké, pro stručnost a potřeby diplomové práce můžeme jmenovat: antituberkulotický, antivirotický, antimykotický úinek. Zvláště antituberkulotické působení derivátů pyrazinamidu a isoniazidu je dle kladně studováno. Ne menší pozornost je věnována antimykotickému působení derivátů pyrazinu. Obě skupiny mají stejný problém, a to nedostatek nových a jiných molekul. To v obou skupinách vedlo k intenzivnímu výzkumu a vývoji nových, a jiných substancí jak na akademických pracovištích, tak ve farmaceutických firmách.

Z mnoha níže zmíněných důvodů (jako například: MDR-TB, XDR-TB, nové šíření tuberkulózy, atd.) je snaha, aby nové látky pokrývaly nejen základní spektrum daných patogenů (*Mycobacterium tuberculosis*, *Trychophyton*, *Microsporium*, *Epidermatophyton*, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*), ale aby také byly aktivní i na atypické kmeny těchto patogeních mikroorganismů. Možností nalezení nových antituberkulotik jsou deriváty pyrazinamidu a isoniazidu, ale i antimykotik ze skupiny jednoduchých pyrazinových molekul bez karboxylové funkce.

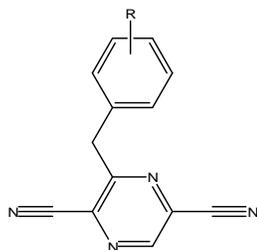
### 3.1.5. Nov syntetizované pyrazinové deriváty

#### 3.1.5.1. Hydrazidové deriváty

Jednou z možností nalezení nových antituberkulotik je syntéza nových hydrazidových derivátů. Byla popsána syntéza série nových derivátů arylidenhydrazidimidazo[1,2-a]pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Zkoumala se biologická aktivita proti bakteriím (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.*), pro vodní mykóz (*Candida albicans*, *C. glabrata*) a antimykobakteriální aktivita proti *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*. Výsledky ukázaly, že dané látky mají mírný inhibiční efekt na lidské patogenní mikroorganismy, zatímco předchozí výsledky ukázaly, že všechny látky jsou inaktivní proti *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.<sup>7</sup>

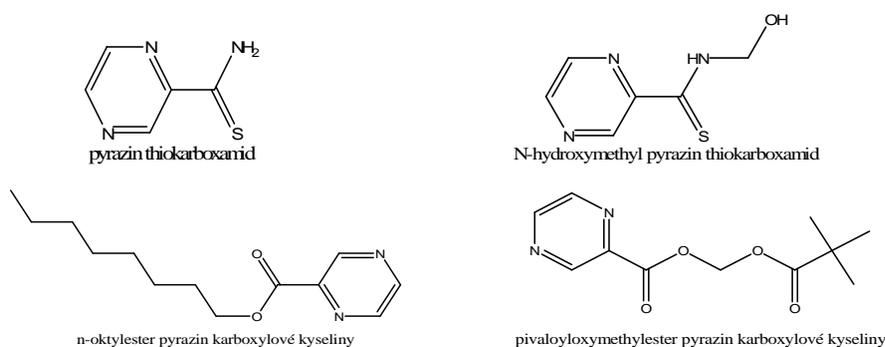
#### 3.1.5.2. Pyrazinamidové deriváty

Další možností nalezení nových účinných látek je ve skupině derivátů pyrazinamidu. Pyrazinamid se svou jednoduchou strukturou dává dobré možnosti k další modifikaci struktury týkající se zvýšení jeho antimykobakteriální aktivity, ale i využití antimykotického potenciálu derivátů pyrazinu. Byly připraveny látky z pyrazin-2,5-karbonitrilu se substituovaným anilínem v poloze 3. Všechny látky byly testovány na antituberkulotickou a antimykotickou aktivitu. Nejlepší aktivita byla nalezena u 3-[[3-(trifluormethyl)fenyl]amino]pyrazin-2,5-karbonitrilu s hodnotou  $6,25 \mu\text{mol}^{-1}$  oproti *M. tuberculosis H37Rv* a průměrnou aktivitou proti dalším mykobakteriálním patogenům.<sup>8</sup>

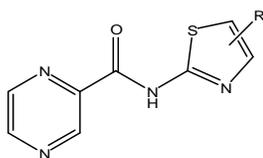


Jak je dobře známo, pyrazinamid má vyšší aktivitu v kyselém prostředí než v neutrálním prostředí, ale vyvíjejících mykobakterií je v kyselém prostředí malý počet. Předchozí experimenty odhalily, že podobnou mykobakteriální aktivitu jako pyrazinamid mají nově syntetizované látky (estery, thioamidy pyrazinkarboxylové kyseliny) a jejich účinnost je v podstatě stejná při pH 5,5 i při pH 6,0. Poté byly fotometricky srovnány aktivity látek oproti pyrazinamidu pomocí optické hustoty (OD) při 530 nm a koncentraci 200  $\mu\text{g/ml}$ . Všechny látky byly rozpuštěné, podle daného

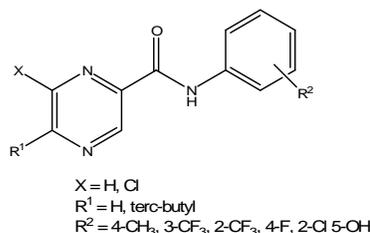
pom ru (OD-TD/OD-PZA)x 100%, do skupin A( 10%), B(11 – 20%), C (21 – 40%), D (41 – 60%), E (61 – 80%). Všechny látky s pom rem nad 80% byly z dalšího testování vy azeny. Mezi nejlépe hodnocené slou eniny se dostaly jmeno vit tyto: n-oktylester pyrazinkarboxylové kyseliny, pivaloyloxymethylester pyrazinkarboxylové kyseliny, pyrazinthiokarboxamid a N-hydroxymethylpyrazinthiokarboxamid. Tyto látky vykazovaly aktivitu A proti *M. tuberculosis* a *M. intracelulare*, ú innost A, B nebo C proti *M. avium komplex*. Jsou tedy považovány za nad jiné kandidáty na antituberkulotika (jejich bakteriostatické a bakteriocidní vlastnosti byly studovány v detailech). Nyní se dané látky sledují v testech in vivo na myších.<sup>9, 10</sup>



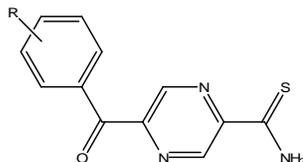
Kondenzací p íslušných chlorid substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny s r zn na kruhu substituovanými aminothiazoly nebo aniliny byla získána série amid . Mezi t mito látkami se hledaly látky s aktivitou proti tbc, antifungální a látky inhibující fotosyntézu. Nejvyšší aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* vykazovala látka 3,5–dibrom–4–hydroxyfenyl substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny (56 – 72 % inhibice); Nejv tší antifungální aktivitu m la látka 5-*tert*-butyl-6-chlor-*N*-(4-methyl-1,3-thiazol-2-yl)-pyrazin-2-karboxamid (MIC = 31,25  $\mu$ mol/ml) proti *Trichophyton mentagrophytes* (nejcitliv jší kmen z všech testovaných).<sup>11</sup>



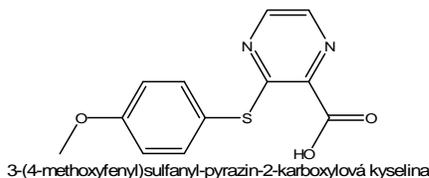
Nesubstituované, halogenované a/nebo alkylované amidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny spojené p es karboxamidový mstek –CONH– se substituovanými aniliny se poda ilo nasyntetizovat b žnými postupy a vyt žilo se 20 nových slou enin, jejichž ú inky byly testovány proti tbc, houbám a plísním a také se zkoumala jejich inhibi ní efekt na fotosyntézu. Nejvyšší aktivitu proti tbc m l 5-*tert*-butyl-6-chlor-*N*-(trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid ) MIC = 3,13  $\mu$ mol/ml). Antifungální aktivitu vykazoval *N*-(3-trifluormethylfenyl)pyrazin-2-karboxamid (MIC = 62,5  $\mu$ mol/ml) proti *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>12</sup>



Další pokusy o nalezení účinných substancí se rodily skrz homolytickou substituci pyrazinového jádra s různě substituovanými aromatickými karbaldehydy. Vznikla série 5-arylpirazin-2-karboxylové kyseliny. Ze všech nasyntetizovaných derivátů pouze 5-(4-chlorbenzoyl)-pyrazin-2-karbothioamid vykazoval inhibiční účinek (90%) na *Mycobacterium tuberculosis* a nejvyšší antifungální efekt s MIC <1.95 μmol/ml proti *Trichophyton mentagrophytes* vykazoval 5-benzoylpirazin-2-karbothioamid. Obecně lze říci, že *in vitro* má vyšší inhibiční efekt thioamidy než odpovídající amidy.<sup>13</sup>



Mezi nadřadnější pokusy lze aditivně ty, které se pokusily zapojit sulfanylovou skupinu do struktury derivátů pyrazin-2-karboxylové kyseliny s methoxybenzenthioley. Dané reakce probíhaly na mnoha různých katalyzátorech. Výsledkem byla série 6- nebo 5- nebo 3-(4-methoxyfenyl)sulfanyl-pyrazin-2-karboxylové kyseliny nebo 6- nebo 5- nebo 3-(3-methoxyfenyl)sulfanyl-pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Našlo se mezi nimi několik látek, které při koncentraci 6,25 μg/ml vykazovaly 50 – 100% inhibiční sílu na virulentní kmen *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.<sup>14</sup>

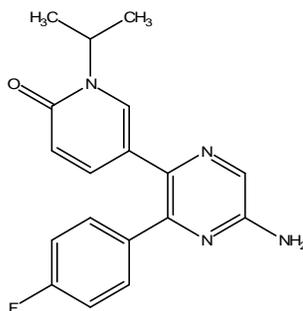


### 3.1.5.3. Pyrazinové deriváty s odlišnými účinky

Mezi další nové zkoumané látky, odvozené od pyrazinu, patří crotonin. Je to pyrazinový derivát izolovaný z rostliny *Croton tiglium*. Jeho struktura byla objasněna spektroskopickou analýzou, jako 2-(furan-2-yl)-5-(2,3,4-trihydroxy-butyl)-1,4-diazin. V testech má pozoruhodnou analgetickou účinnost.<sup>15</sup>



Další látkou je ASP-5854, duální adenosinový A<sub>1</sub> a A<sub>2A</sub> receptorový antagonist. V testech se zkoumala jeho účinnost na modelu Parkinsonovy nemoci a schopnosti poznávání. K daným receptorovým místům se vázal s vysokou specifitou a afinitou. Jeho výsledky byly nad jiné.<sup>16</sup>



ASP-5854 = 5-(5-amino-3-(4-fluorofenyl)pyrazin-2-yl)-1-isopropylpyridin-2(1H)-on

## 3.2. Tuberkulóza

Podle WHO představuje tuberkulóza (tbc) z celosvětového hlediska jeden z nejtěžších zdravotnických problémů<sup>17</sup>. Odhady hovoří o tom, že ročně vzniká až 8 milionů nových případů tbc a 2,8 milionu osob ročně zemře na choroby přímo nebo nepřímo související s tbc<sup>18</sup>. Do popředí se přitom dostává problém rezistence tuberkulózy, a už monorezistence (9,9%) nebo multirezistence (1,6% případů). Nejvíce tbc postihnutými státy jsou: Indie, Rusko, Litva, Estonsko, Dominikánská republika, Argentína, Pobřeží Slonoviny<sup>17</sup> (přitom až 90% případů onemocnění pochází z rozvojových oblastí). Nesmíme zapomenout, že tbc se díky celosvětové globalizaci dostává do míst, kde byla dlouhou dobu pod kontrolou.

### 3.2.1. Původci onemocnění, rizika, rizikové skupiny

Tuberkulóza (původce objeven roku 1882 Robertem Kochem<sup>19</sup>) je infekční onemocnění způsobené mikroorganismy *Mycobacterium tuberculosis*. Je to aerobní, nepohyblivá, acidorezistentní tyinka, která žije intracelulárně, zejména ve fagocytech, kam se dostávají fagocytózou.<sup>20</sup> Zvláštností je vysoký podíl lipidních látek (až 40%)<sup>21</sup>. Méně často je toto onemocnění způsobeno mikroorganismy *Mycobacterium bovis* i *Mycobacterium africanum*. Hlavním postiženým orgánem jsou plicе, ale takzvaná mimoplicní tbc může vyvolat chorobný proces i v jiných orgánových strukturách (ledviny, pohlavní ústrojí, CNS, GIT). Výskyt mykobakterií, které jsou vyvolané tzv. atypickými mykobakteriemi (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*) a které souvisí se stavem s oslabenou i sníženou imunitou (HIV pozitivní, lidé s AIDS, pacienti, kterým jsou podávána imunosupresiva...), stoupá!<sup>22, 23</sup> Mykobakterie se šíří vzdušnou cestou, do organismu vstupují dýchací soustavou, nejčastěji jde tedy o kapénkový přenos infekce.<sup>24</sup> Takzvaná 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 (zvýšené riziko je při: diabetes mellitus, HIV infekci, užívání imunosupresiv, aj.). 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.<sup>25</sup>

## 3.2.2. Léčba tbc

### 3.2.2.1. Pohled léků proti tbc

Cílem léčby tbc je vyléčení nemocného, prevence následků tbc a relaps, zamezení přenosu na ostatní osoby.<sup>26</sup> Mezi dnes používaná antituberkulotika (AT) patří: izoniazid, rifampicin – nejsilnější baktericidní léky, pyrazinamid – účinný zvláště v kyselém prostředí, streptomycin – působí převážně proti bakteriím (BK) v extracelulárním prostředí, ethambutol – je účinný převážně v kombinacích s předešlými léky. Nejde opomenout *para*-aminosalicylovou kyselinu (PAS) vzhledem ke svému použití v rozvojových zemích (oblíbená vzhledem ke své ceně). Dalšími látkami, které se používají k léčbě tbc vzhledem k rezistenci na ostatní AT jsou: fluorochinolony (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin), cykloserin, další aminoglykosidy (kapreomycin, kanamycin), ethionamid, prothionamid, PAS, terizidon.

1. skupina	izoniazid, pyrazinamid, rifampicin, ethambutol
2. skupina	streptomycin, kanamycin, amikacin, kapreomycin
3. skupina	fluorochinolony - ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin
4. skupina	bakteriostatická AT - ethionamid, prothionamid, cykloserin, PAS, terizidon
5. skupina	nejasná účinnost - klarithromycin, klofazimin, amoxicilin/klavulanát

**tabulka 1 – látky používané k terapii tbc<sup>29</sup>**

### 3.2.2.2. Očkování

Jedinou prevencí nakažení se tbc je očkování. Spoléhá v aplikaci oslabeného kmene *Mycobacterium bovis*. Tento kmen společně vykultivovali Calmette a Guerin v roce 1921, po téměř 13 letech nesnadné práce, a tento kmen ztratil značnou část svojí virulence.<sup>27</sup> Tento kmen byl na jejich počest pojmenován *Bacillus Calmette – Guerin* (BCG) a očkování proti tbc se nazývá kalmetizací. Kalmetizace je dnes aplikována ve většině zemí kontinentu. 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 přeočkování. Od roku 2001 se v ČR užívá dánská vakcína SSI Kopenhagen, která je připravena z dánského kmene 1331.<sup>27</sup>

### 3.2.2.3. Léčebný program tbc

Léčba tuberkulózy, vzhledem k narůstajícímu nebezpečí rezistence a nedostatku antituberkulotik, se uskutečňuje v kombinacích výše zmíněných AT. Ke standardní kombinaci patří isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol (resp. streptomycin) v iniciační fázi (2 – 3 měsíce), poté se pokračuje další 4 měsíce už pouze ve dvojkombinaci: isoniazid, rifampicin. Po šesti (sedmi) měsících se dosahuje 95% úspěšnosti léčby bez relapsu.<sup>24, 28</sup> U recidiv se používají schémata s pětikombinací (isoniazid, rifampicin, pyrazinamid, ethambutol, streptomycin) v iniciační fázi a trojkombinací (isoniazid, rifampicin, ethambutol) v pokračovací fázi.<sup>24</sup> V indikovaných případech jak plicní, tak i mimoplicní tbc lze danou medikamentózní léčbu ještě rozšířit o chirurgický zákrok (minimálně po dvou měsících neúspěšné léčby).<sup>29</sup>

### 3.2.2.4. Rezistence na antituberkulotika

Komplikací léčby je rezistence, která se podle klasického dělení rozděluje na primární – infekce již rezistentním kmenem, špatná diagnóza a tudíž špatně zvolená terapie; a sekundární (= získaná) – rezistence vzniká až po nasazení léčby, která tím pádem selhává. Dále můžeme rezistenci dělit 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<sup>29</sup>. 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).<sup>30, 31</sup> Hovoří se, že XDR-TB tvoří v dnešní době 4 – 19 % všech MDR-TB (multi drug resistant tuberculosis)<sup>32</sup>.

Možnost léčby odolných kmenů tuberkulózy je obtížná, a to z důvodů epidemiologických, terapeutických (akceptovatelnost, toxicita léku), ale i ekonomických<sup>24</sup>. Proto WHO doporučila léčbu rezistentních forem *M. tuberculosis* ve specializovaných zařízeních, kde je zkušenost s používáním AT druhé řady, monitorování léčby po dobu terapie<sup>29</sup>.

Pro léky druhé volby je příznivě menší lébný efekt a vyšší výskyt závažnějších nežádoucích účinků (NÚ). Na tyto léky je třeba provádět testy účinnosti.<sup>19</sup>

rezistence na	iniciální fáze		pokračovací fáze	
	léky	minimum trvání v měsících	léky	trvání v měsících
izoniazid (streptomycin)	1. rifampicin	2-3	1. rifampicin	6
	2. aminoglykosid	2-3	2. ethambutol	6
	3. pyrazinamid	2-3		
	4. etambutol	2-3		
izoniazid, etambutol (streptomycin)	1. rifampicin	3	1. rifampicin	6
	2. aminoglykosid	3	2. ethionamid	6
	3. pyrazinamid	3		
	4. ethionamid	3		
izoniazid, rifampicin, streptomycin	1. aminoglykosid	3	1. ethionamid	18
	2. ethionamid	3	2. ofloxacin	18
	3. pyrazinamid	3	3. ethambutol	18
	4. ofloxacin	3		
	5. ethambutol	3		
izoniazid, rifampicin, streptomycin, etambutol	1. aminoglykosid	3	1. ethionamid	18
	2. ethionamid	3	2. ofloxacin	18
	3. pyrazinamid	3	3. cykloserin	18
	4. ofloxacin	3		
	5. cyklosetin	3		

tabulka 2 – kombinace léků v případě rezistence na antituberkulotika  
1. ady<sup>24</sup>

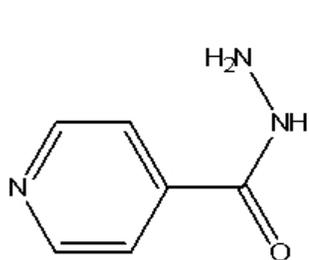
### 3.2.2.5. Nové sloučeniny vyvíjené k léčbě TB

Celosvětový zájem o nalezení nových účinných látek je značný, mluví se o dokumentování výběrů článků v oblasti derivátů pyrazinu, kde se více zabývá deriváty pyrazinamidu, který je stále jedním z nejvíce účinných baktericidních chemoterapeutik používaných k léčbě TB.

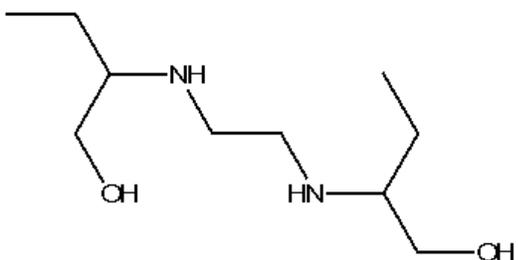
K dalším potenciálně účinným látkám by se mohly adit následující chemická individua, která v sobě skrývají antituberkulotický potenciál. Současné studie se zabývají aktivitou nových fluorochinolonů – levofloxacin, moxifloxacin a gatifloxacin. Jejich použití jako léků první linie se nyní zkoumá. Mezi další molekuly, které jsou vyvíjeny na léčbu TB patří diarylchinolony (R207910), nitroimidazopyrany (PA-824, OPC-67683), analogy ethambutolu (SQ-109) a další.<sup>33</sup>

### 3.2.3. Vzorce lé iv používaných k terapii tbc:

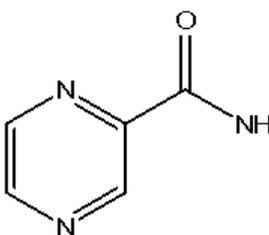
#### 3.2.3.1. Lé iva 1. ady:



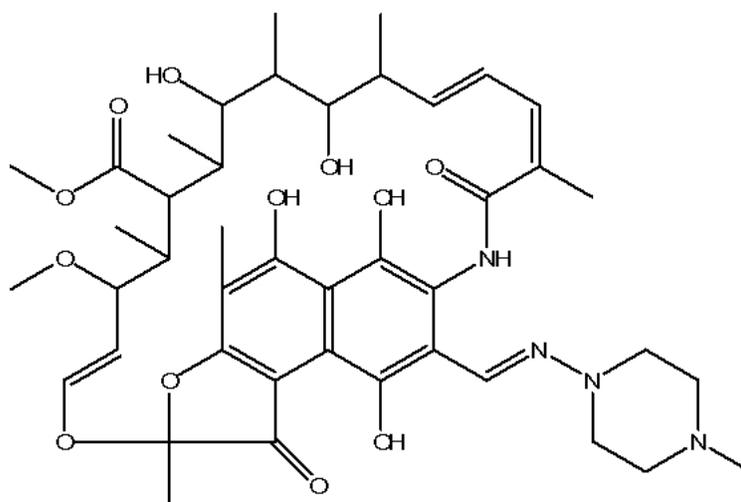
Obrázek 8 – isoniazid



Obrázek 9 - ethambutol

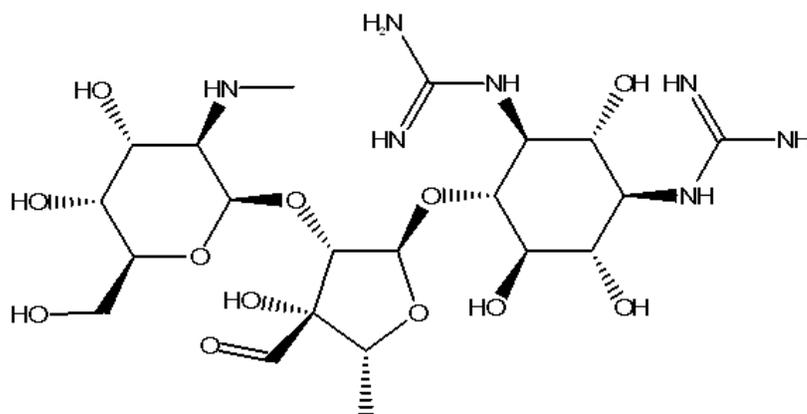


Obrázek 10 – pyrazinamid

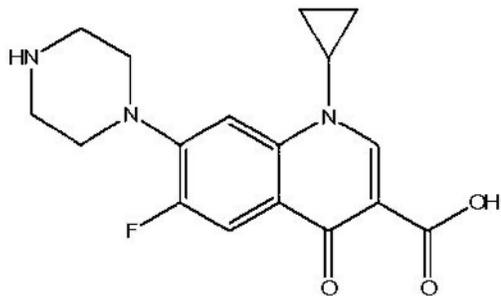


Obrázek 11 – rifampicin

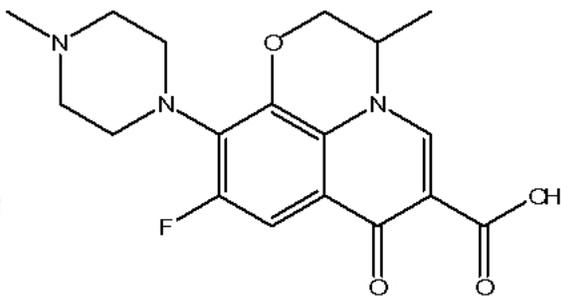
#### 3.2.3.2. Lé iva 2. ady:



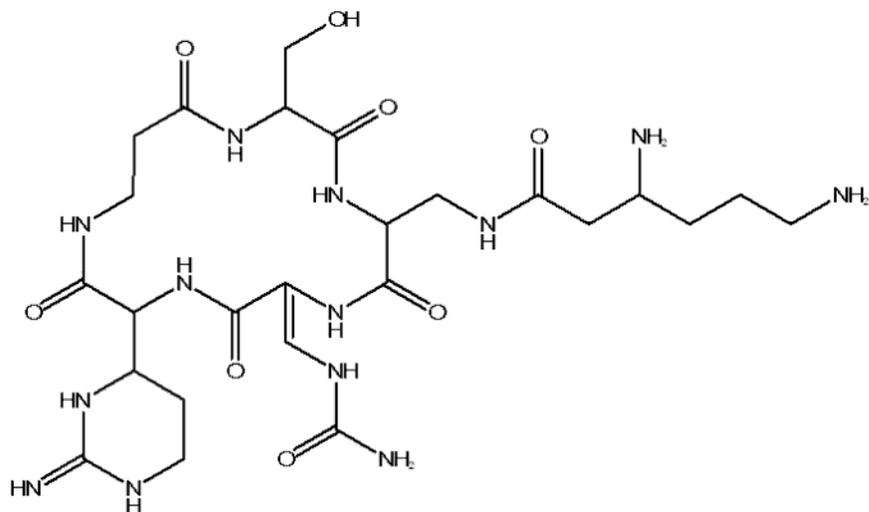
Obrázek 12 – streptomycin



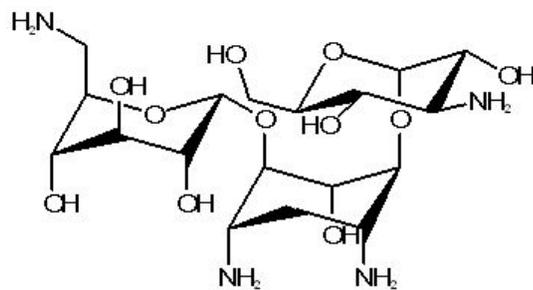
Obrázek 13 – ciprofloxacin



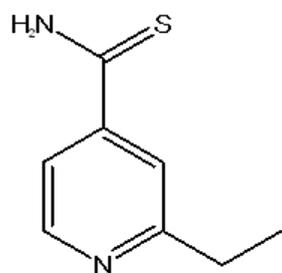
Obrázek 14 – ofloxacin



Obrázek 15 – kapreomycin



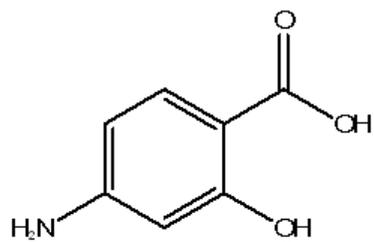
Obrázek 16 – kanamycin



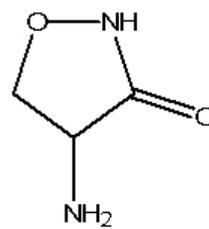
Obrázek 17 - ethionamid



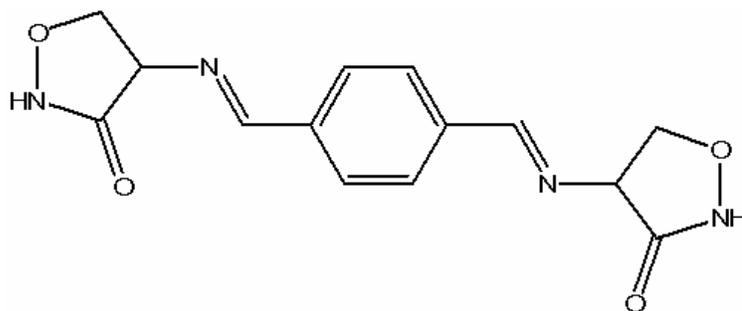
Obrázek 18 – prothionamid



Obrázek 19 – *para*-aminosalicylová kyselina



Obrázek 20 - cykloserin



Obrázek 21 – terizidon

## 3.3. Mykózy

Antifungální látky specificky působí na houbové organismy, které jsou patogenní pro člověka. Mohou být syntetického (azolové, allylaminové deriváty, flucytosin), přírodního (polyenová atb, griseofulvin) nebo polosyntetického původu (echinokandinové deriváty). Odlišností od antibiotik je skutečnost, že antimykotika zápasí s eukaryotním organismem. Z toho lze vyvozovat, že dané látky mohou být po systémovém podání značně toxické. Přesto lze najít řadu rozdílů mezi lidskou a mykotickou buňkou, které zaručí dostatečně specifický účinek (zejména obsah ergosterolu v buněčné stěně až na výjimky všechny látky působí inhibičně na syntézu ergosterolu).

### 3.3.1. Původci mykóz

Původce mykóz můžeme rozdělit na houby vláknité: rod *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermatophyton*. Jsou to takzvané keratinofilní houby, které pomocí keratináz využívají keratin v kůži i kožních adnexách (vlasy, nehty) jako zdroj potravy. Dále to jsou kvasinky: rod *Candida* a *Cryptococcus*. Nejčastěji způsobují infekce sliznic (orofaryngeální, vaginální, aj. infekce). U imunitně oslabených jedinců mohou vyvolat infekce vnitřních orgánů.

### 3.3.2. Rozdělení mykóz

Dále podle lokalizace dělíme mykózy na lokální (postiženy jsou pouze sliznice, kůže nebo kožní adnexa) a systémové (mezi původce patří *Candida spp.*, *Aspergillus*, zygomycety).

#### 3.3.2.1. Povrchové mykózy

Co se týče léčby povrchových mykóz, používá se celá škála lokálně podávaných antimykotik z různých chemických skupin. Jejich podání nenesou riziko zvýšené toxicity, podání ve složitých lékových formách, atd. Jedná se o relativně asymptomatické onemocnění, která jsou nepříjemná a mohou snižovat kvalitu života. Je nutné říci, že u jedinců s normálně fungujícím imunitním systémem pacienta neohrožují na život. Existují onemocnění, zaměření, u nichž je výskyt dermatofytóz častější. Je to například diabetes mellitus, obezita, práce ve vlhkém prostředí, atd. U onychomykóz se kombinuje podání keratolytických prostředků s lokálními antimykotiky.

K lokální působícím antimykotikům se přidají **a)** specifické látky působící proti houbovým organismům, mezi něž patří: polyeny (nystatin, natamycin), azolové deriváty (klotrimazol, ketokonazol, ekonazol), allylaminy (terbinafin), ciklopirox a **b)** nespecifické látky s fungistatickým účinkem. K této skupině patří: organické kyseliny (undecylová), aldehydy (formaldehyd), deriváty fenolu, jod (Lugol v roztok), dehty (př. lithanthracis,...), barviva (fuchsin, genciánová violá).

### 3.3.2.2. Systémové mykózy

K vážnějším problémům terapie patří systémové mykózy. Lze říci, že dnes máme relativně širokou paletu antimykotických preparátů různé chemické podstaty, nutno však dodat, že v klinické praxi toto platí pouze o látkách k místnímu podání. Do roku 2000 bylo k dispozici pouhých šest(!) léků, z toho tři využívané k terapii - amfotericin B, flukonazol, itrakonazol.<sup>34</sup>

Systémové mykózy jsou poměrně vzácné, často souvisí s nozokomiálními nákazami (v USA a Evropě představují oportunní onemocnění vyvolané mykotickými patogeny u rizikových skupin 4. – 7. nejčastější etiologii nozokomiální infekce)<sup>34</sup>, imunosupresí – AIDS, transplantace, katetrizací, celkovou parenterální výživou, popáleninami, chemoterapií, rozsáhlým používáním širokospektrých antibiotik.

### 3.3.3. Přehled používaných látek

#### 3.3.3.1. Azolová chemoterapeutika

Azolová chemoterapeutika lze rozdělit na deriváty imidazolu a deriváty triazolu. Mají prakticky stejný mechanismus účinku, který inhibuje syntézu ergosterolu. Tento mechanismus je selektivnější u triazolů, což má dopad na výskyt a závažnost nežádoucích účinků<sup>34</sup>. K látkám patřícím do podskupiny imidazolových derivátů patří: ekonazol, klotrimazol, ketokonazol. Látky patřící do podskupiny triazolových derivátů mají také širší spektrum hub. Patří sem: flukonazol, itrakonazol, vorikonazol a do poslední fáze klinického zkoušení se prosadily revukonazol (kvasinky, aspergily a flukonazol rezistentní kmeny) a posakonazol (široké spektrum + vystupovaný účinek proti aspergilym)<sup>34</sup>.

#### 3.3.3.2. Polyenová antibiotika

Používaná polyenová antibiotika jsou amfotericin B, nystatin a natamycin. Jsou podobné makrolidovým antibiotikům, mají nejširší spektrum účinku, které tkví

v narušení bariérové funkce plasmatické membrány. K systémové léčbě se používá pouze amfotericin B, který se podaří upravit do takových lékových forem, kdy se snížila jeho toxicita (nefro-, hepatotoxicita, anémie, alergie, GIT nesnášenlivost – společně pro všechny polyeny) a zvýšila jeho rozpustnost ve vodě, takže se mohou podávat jeho vyšší dávky bez rizika zvýšené toxicity<sup>34</sup>.

### 3.3.3.3. Allylaminy

Allylaminové deriváty inhibují syntézu ergosterolu. Mezi klinicky používané látky patří terbinafin. Terbinafin se dá použít pro systémovou léčbu, ale pouze u léčby onychomykózy.

### 3.3.3.4. Ciklopirox

Ciklopirox má široké antifungální působení, velice dobře proniká do hlubších vrstev kůže a nehtů. Jako jeden z mála neovlivňuje syntézu sterolů, má nízkou permeabilitu membrány, čímž dochází ke narušení transportu bílkovin<sup>32</sup>.

### 3.3.3.5. Flucytosin

Flucytosin, původně vyvinutý jako antineoplastikum – antimetabolit. V mykotické léčbě dochází ke konverzi na 5-fluorouracil. Nevýhodou je relativně vysoký výskyt primární rezistence a rychlý vývoj sekundární rezistence. Proto je dnes v monoterapii kontraindikován.<sup>32</sup>

### 3.3.3.6. Griseofulvin

Griseofulvin je antibiotikum pocházející z mikromycety *Penicillium griseofulvum*. Jeho spektrum účinku zahrnuje pouze dermatofytózy. Je špatně rozpustný ve vodě. Jeho mechanismus účinku je inhibice vzniku mitotického vstříčku.<sup>35</sup>

### 3.3.3.7. Echinokandiny

V poslední době jsou studovány zejména inhibitory buněčné stěny hub. Zatímco echinokandiny a pneumokandiny jsou deriváty mastných kyselin a cyklických hexapeptidů, papulakandiny jsou estery mastných kyselin a disacharidu  $\beta$ -(1,4)-galaktosylglukosy. Tyto látky inhibují syntézu  $\beta$ -(1,3)-glukanu, které jsou hlavní součástí houbové buněčné stěny. Z echinokandinů jmenujme kaspofungin (cidní proti

kandidám a statický v i aspergil m). Další „kandiny“ vstupují do posledních fází klinického hodnocení.<sup>34</sup>

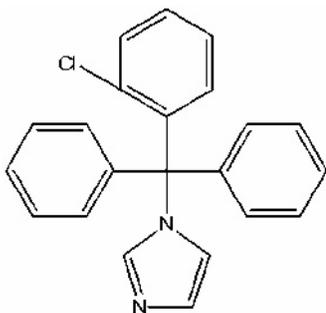
skupina	polyen	antimetabolit	triazoly			echinokandiny
onemocnění	amfotericin B	flucytosin	itrakonazol	flukonazol	vorikonazol	kaspofungin
aspergilóza	+	-	+	-		
kandidóza	+	+	+		+	
kokcidiomykóza		-		+	+	-
kryptokokóza		+	+	+	+	+
histoplazmóza		-	+	+	+	-
mukoplasmóza		-	-	-	-	-

lék volby, + ú jiné lé ivo, - neú jiné lé ivo

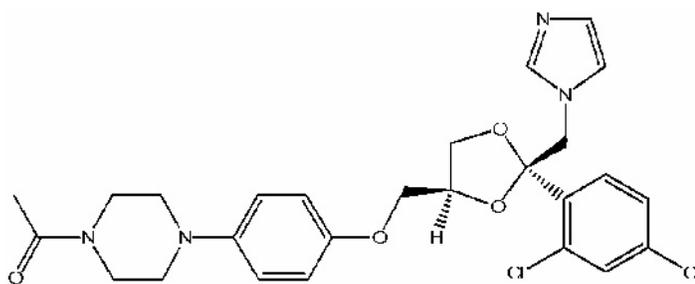
tabulka 3 – hlavní indikace systémových antimykotik<sup>34</sup>

Prioritou výzkumu je nalezení látek potlačující oportunní p vodce mykóz jako jsou aspergily, mukory, fusaria nebo kvasinky se sníženou citlivostí, pro které dnes nemáme aktivní terapii.

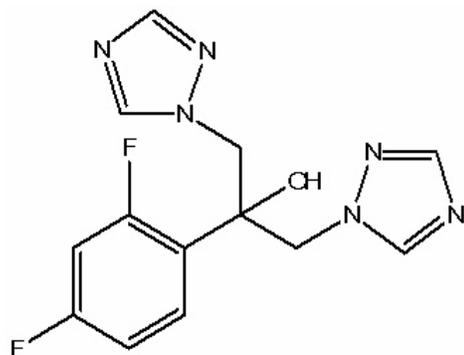
### 3.3.4. Vzorce vybraných antimykotik :



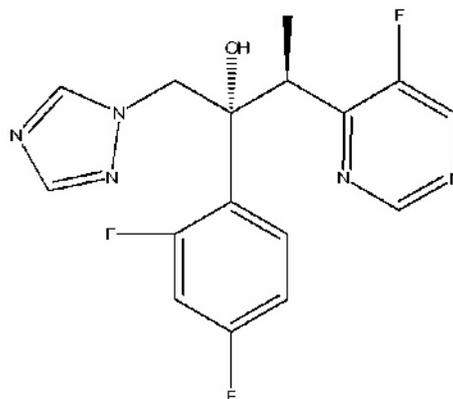
Obrázek 22 – klotrimazol



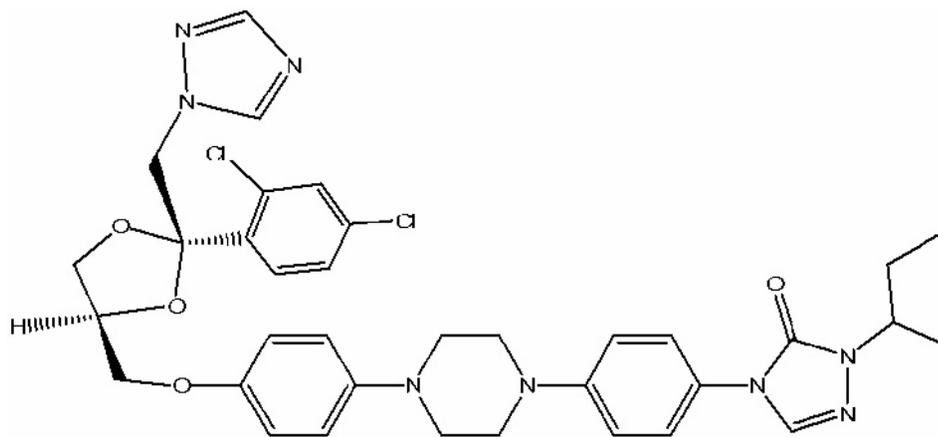
Obrázek 23 - ketokonazol



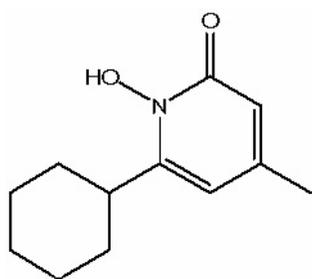
Obrázek 24 - flukonazol



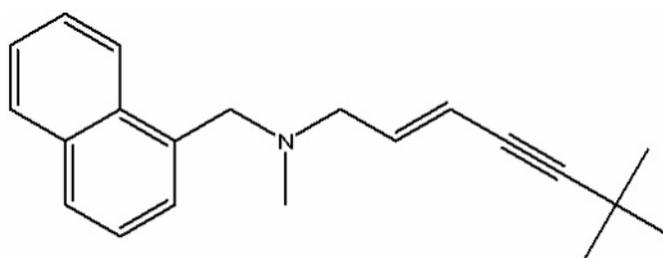
Obrázek 25 – vorikonazol



Obrázek 26 - itrakonazol

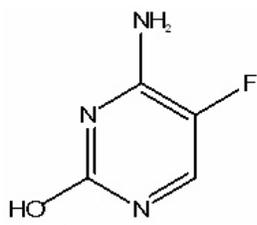


Obrázek 27 – ciklopirox

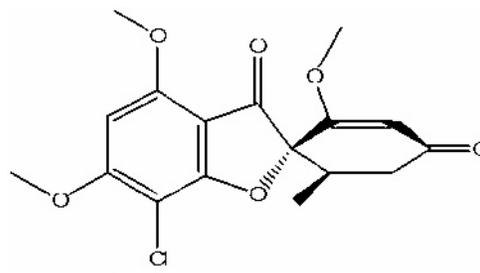


terbinafin

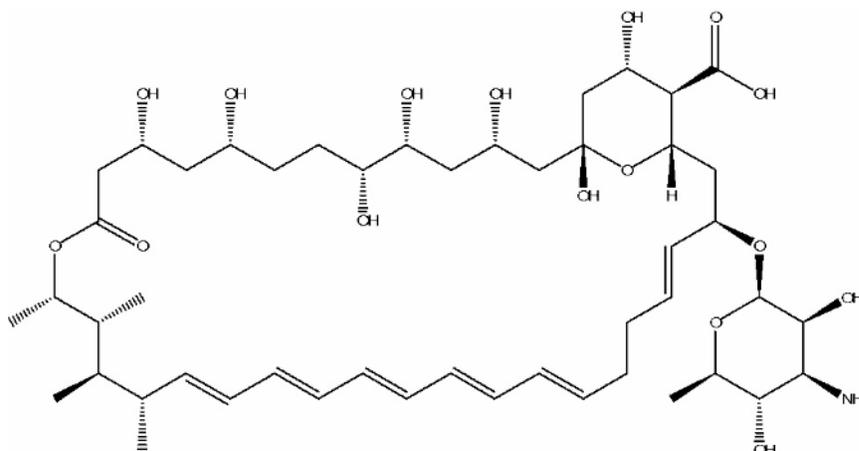
Obrázek 28 – terbinafin



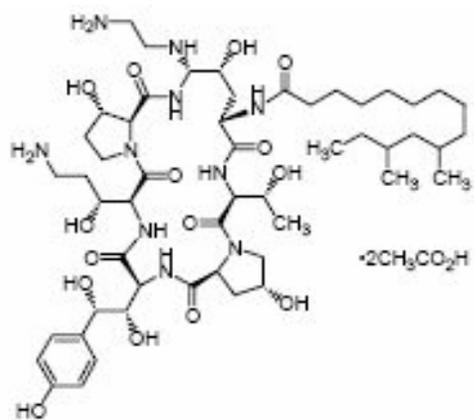
Obrázek 29 – flucytosin



Obrázek 30 - griseofulvin



Obrázek 31 – amfotericin B



Obrázek 32 - kaspofungin

## 3.4. Antivirotika

Antivirotika m se v nuji proto, že v nedávné dob byly objeveny nad jiné látky s antivirotickým ú inkem a tyto látky mají ve struktu e obsažen 1,4 diazinový kruh, který není složit substituován a v jistých aspektech se podobá mnou syntetizovaným látkám. Mezi tyto perspektivní látky pat í flutimid a T-705 (u n kterých autor ozna ován jako favipiravir<sup>36</sup>).

Antivirotika jsou heterogenní skupina látek, které zasahují do r zných vývojových cykl vir v hostitelské bu ce. Využívá se p itom p edevším rozdíl v mechanismech a kinetice syntézy virových a bun ných struktur. P í virové infekci vniká nukleová kyselina (NK) do hostitelské bu ky a zásadn m ní její metabolismus. Vy azuje z innosti DNA hostitele a využívá metabolického aparátu k syntéze nových virových ástic. Tím vnáší do bu ky novou genetickou informaci a ruší tak p vodní genetický zápis. P itom probíhají pro virus specifické metabolické d je, které p edstavují cílová místa pro farmakoterapeutický zásah.<sup>37</sup>

### 3.4.1. Rozd lení antivirotik

Antivirotika m žeme rozd lit podle mechanismu ú inku do n kolika skupin. A to látky, které inhibují syntézu virové NK. Dále látky blokující p ipojení, penetraci a nebo „uncoasting“ (= odplášt ní) viru a látky interferující s virovým metabolismem protein .

#### 3.4.1.1. Látky blokující syntézu virové NK

Ve skupin látek blokujících syntézu NK máme dv velké poskupiny. Jednak látky inhibující DNA polymerasu a dále inhibitory reverzní transkriptázy (RT; RNA - dependentní DNA polymeráza). V obou skupinách se jedná o analogy purinových, pyrimidinových nukleosid a nenukleosidové inhibitory.

#### 3.4.1.2. Láky interferující s virovým metabolismem

K látkám interferujícím s virovým metabolismem protein pat í inhibitory HIV proteasy. Je to specifický enzym viru HIV, který dokon uje životní cyklus HIV odšt pením glykoproteinového obalu nezralého viru a umož ũje vznik nových infek ních ástic. Používají se výhradn s dalšími antiretrovirotiky, aby se zabránilo rezistenci a prodloužilo asymptomatické stadium nemoci.

### 3.4.1.3. Látky vstupující do vývojových stádií

Látky blokující připojení, penetraci a nebo „uncoasting“ (= odpláštění) viru jsou jednak amantadin a pak nejmladší skupina antivirotik, a to inhibitory neuramidázy. Jsou to látky působící proti virus ch ipky. Neuramidáza je specifický enzym, jenž katalyzuje odštěpení virion od hostitelské buňky a způsobuje tak šíření virion po organismu. K těmto léivm adíme zanamivir a oseltamivir.

### 3.4.2. T-705

Velmi nadějná látka T-705 (6-fluoro-3-hydroxypyrazin-2-karboxamid) byla zkoumána jako účinná a selektivní sloučenina proti virus ch ipky. V in vitro testech látka vykazovala účinek proti virus ch ipky A, B i C s inhibiční koncentrací IC(50) od 0,013 do 0,48 µg/ml, zatímco výsledky neukazovaly žádnou cytotoxicitu nad 1,0 µg/ml na buňkách psích ledvin. Index selektivity pro virus ch ipky byl větší než 2,0. Sloučenina byla také aktivní v i vir m rezistentních k inhibitor m neuramidázy a n kterým vir m rezistentních k amantadinu. Výsledky ukazovaly i slabou aktivitu v i nech ipkovým RNA vir m (Výzkum v této oblasti vir se soustředí na vývoj účinných látek proti „orthomyxoviruses“ (viry ch ipky), „hepaciviruses“ (hepatitis C virus, HCV), a v menším rozsahu „picornaviruses“. Zatímco na vir ch ipky máme dnes běžně použitelná léiva, pro infekce způsobené HCV se dnes používá jen kombinace interferonu a ribavirinu. Dnes se vyvíjejí kolik látek specificky zaměřených na HCV proteázu a/nebo polymerázu a dá se očekávat jejich vstup na trh.)<sup>36</sup> a žádnou aktivitu proti DNA vir m. V in vivo testech na myších byly výrazně zredukovány virová rezidua v plicích a úmrtnost. Tyto výsledky naznačily, že T-705 může být sloučenina s vysokým potenciálem a selektivností na vir ch ipky (který se nejčastěji u zdravých lidí projevuje horečnatým onemocněním horních cest dýchacích, ale u dětí, starších pacientů, imunodeficientních a chronicky nemocných lidí se může vyvinout život ohrožující primární virovou plicní pneumonií nebo jiné komplikace)<sup>38</sup> a že má jiný mechanismus účinku (Cíleně zasahuje raný až střední stupeň virové replikace, ale nemá žádný efekt na vnošení nebo uvolnění viru. Jeho účinnost snižuje především puriny i purinových nukleotidů, zatímco pyrimidiny ji neovlivní. Aktivní forma T-705 je T-705-4-ribofuranosyl-5'-trifosfát (T-705RTP), v menší míře vzniká T-705-4-ribofuranosyl-5'-monofosfát, který inhibuje buněnou IMP dehydrogenázu, ale 150krát slaběji než ribavirin monofosfát. T-705RTP je selektivním inhibitorem virové RNA polymerázy, ale narušil od ribavirinu neovlivňuje buněnou syntézu DNA i RNA.)<sup>39</sup> než ostatní komerčně používané léiva.<sup>40</sup>

Mezi další onemocnění, na které má vliv podání T-705 se řadí ptáčí chřipka H5N1, která se před nedávnem objevila v jihovýchodní Asii. Pacienti s ptáčí chřipkou ji prezentovaly jako horečnaté onemocnění s kašlem a krátkým dechem, který se vyvíjel v zástavu dýchání. Ptáčí sezónní chřipce zůstává zdroj infekce v dýchacích cestách, ale u ptáčí chřipky dochází k systémovému rozšíření infekce, vysokým hladinám cytokinů a multiorgánovému selhání.<sup>38</sup> Efektivní koncentrace s účinností 90 % byla od 1,3 do 7,7 μmol. Experimenty na myších ukázaly, že podání T-705 jednu hodinu po expozici virem H5N1 vedlo k vysokému zamezení infekce. Dávkovací režim byl dobře tolerován a každého jedince ochránil před smrtí. V paralelním testu byl použit oseltamivir, ten byl pouze slabě efektivní.<sup>41</sup>

T-705 vykazoval ještě další úinky. Můžeme jmenovat protektivní účinek proti viru Západního Nilu. Při jeho podávání subkutánně v závislosti na dávce se snížila úmrtnost, redukovaly se virové proteiny v séru i v CNS.<sup>42</sup>



vzorec T-705

### 3.4.3. Flutimid

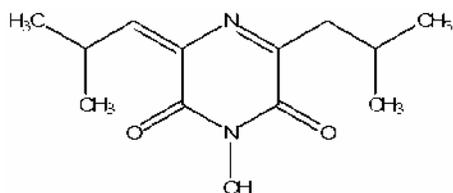
Další perspektivní látkou je flutimid, plně substituovaný 1-hydroxy-3H-pyrazin-2,6-dion. Je to fungální metabolit, izolovaný z nového druhu *Delitschia cofertaspóra*<sup>43</sup> (F.Palaez, J.D. Polishook, M. Valldosera, and J. Guaro, *Mycotaxon* 50:115-122, 1994), který byl objeven v hnojivu, které bylo sebráno v Namibii. Ukázalo se, že specificky a cíleně napadá endonukleázu (transkriptáza) viru chřipky A i B (neovlivňuje inicializaci ani elongaci při syntéze virové mRNA), bez vedlejšího vlivu na ostatní polymerázy.<sup>44</sup>

Studování vztahu mezi účinkem a strukturou přineslo tyto závěry. N-hydroxylová skupina a olefinové centrum jsou potřebné pro zachování účinku. Blokování N-hydroxy skupiny nebo její odstranění vede ke snížení účinku o 70 bodů, dále že je nutné zachování alespoň jedné olefinové skupiny.<sup>44</sup>

Dále byla snaha připravit další deriváty flutimidu, které by mohly rozšířit paletu léků proti chřipce. Nejúčinnějšími deriváty substituovanými na C5 se staly *para*-fluorfenyl a *para*-methoxyfenyldiketopiperazín.<sup>43</sup>

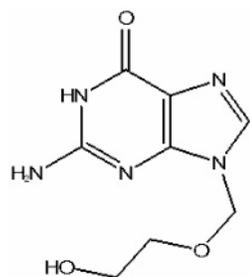
Přesto, že nejúčinnější byly více schopné inhibovat chřipkovou endonukleázu, byla u nich objevena možná cytotoxicita při dávkách vyšších než 10 μM. Proto jako

nejvíce použitelnou látkou se jeví flutimid, který nevykazoval žádnou cytotoxicitu p i dávce vyšší než 100  $\mu\text{M}$ , a jeho  $\text{IC}_{50}$  bylo stanoveno na 5,9  $\mu\text{M}$ .<sup>44</sup>

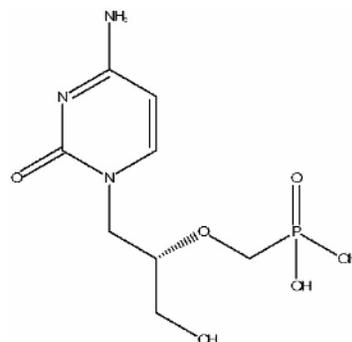


vzorec flutimidu

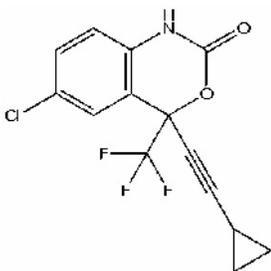
### 3.4.4. Vzorce k ásti antivirotika:



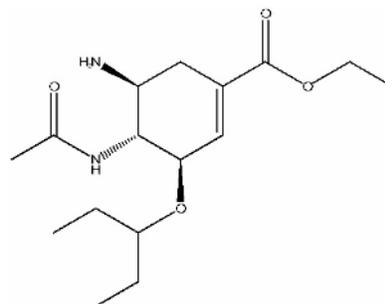
Obrázek 33 – aciklovir



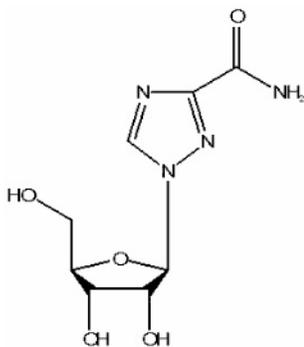
Obrázek 34 – cidofovir



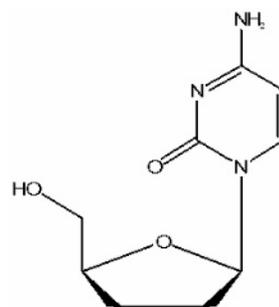
Obrázek 35 – efavirenz



Obrázek 36 – oseltamivir



Obrázek 37 – ribavirin



Obrázek 38 – zalcitabin

## 4. Metodická část

### 4.1. Pyrazin

#### 4.1.1. Obecné a fyzikální vlastnosti

Pyrazin je symetrická, planární molekula, je slabě aromatičtější. Je slabou bazí, bazicita je srovnatelná s alifatickými terciálními aminy, chová se jako dvojnásobná base  $pK_1 = 0,57$ ;  $pK_2 = -5,51$ .<sup>45</sup> Ve srovnání s ostatními šestičlennými heterocykly se odlišuje tím, že heteroatomy dusíku je pyrazin nejslabší bazí. Celá tato skupina jsou slabší base než pyridin. Pro srovnání  $pK_a$  pyridinu je 5,2; pyrazinu 0,7; pyrimidinu 1,3; pyridazinu 2,3. Ačkoli je podle síly bazí pyrazinu, pyrimidinu a pyridazinu neekvivalentní, může polární příspěvek dusíku pomoci vysvětlit rozdíl mezi pyrazinem a pyrimidinem. Ale bazicita pyridazinu se může zdát anomální. To může být vysvětleno tak, že odpudivost elektronových párů umocní bazicitu sousedního dusíku, který destabilizuje neutrální bazi vztahující se ke konjugované kyselině.

Pyrazin je charakterizován jako bílá, krystalická zápachající látka. Je rozpustný ve vodě, teplota tání 54 °C, teplotou varu 115 °C. Je vysoce hořlavý, dráždivý a hygroskopický.<sup>46</sup>



#### 4.1.2. Chemické vlastnosti

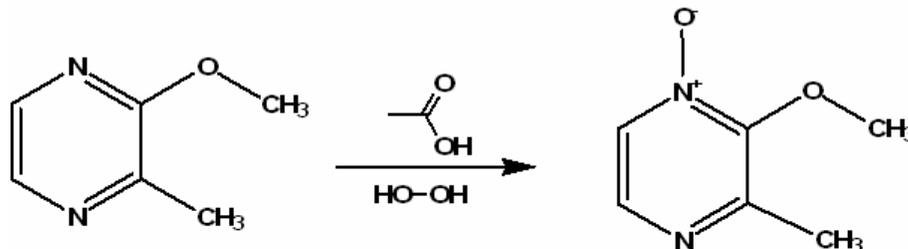
Co se týče jeho chemických vlastností, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, kvůli indukčnímu efektu dusíkových atomů, tedy existenci hybridních struktur, které jsou zdrojem kladného náboje na atomech dusíku heterocyklu. Z těchto důvodů je pyrazin přístupnější nukleofilním substitucím, zvláště, pokud je jádro heterocyklu aktivováno například N-oxidací. Je zřejmé, že reaktivitu pyrazinu ovlivňují též substituenty na aromatičtém kruhu.

#### 4.1.3. 2-methoxy-3-methylpyrazin

2-methoxy-3-methylpyrazin je základní látkou, která tvoří strukturální základ nově syntetizovaných látek. Je to při laboratorní teplotě kapalná látka, silně

charakteristické v n . Molekulová hmotnost je 124 g/mol. Vyskytuje se nap .: ve vín (konkrétn v druhu Cabernet Sauvignon), ale je také obsažen v cigaretovém kou í<sup>47</sup>.

## 4.2. N-oxidace



Jak už bylo e eno výše, pyrazin nepodléhá snadno elektrofilním substitucím (snížená aromaticita; indukivní efekt dusík ), podstatn lépe reaguje za podmínek substituce nukleofilní, zvlášt pokud se pyrazinové jádro p edem aktivuje N-oxidací.

### 4.2.1. Vliv reak ních podmínek

N-oxidace m že probíhat do prvního nebo do druhého stupn . Vše závisí na zvolených reak ních podmínkách, vlastnostech substituent .

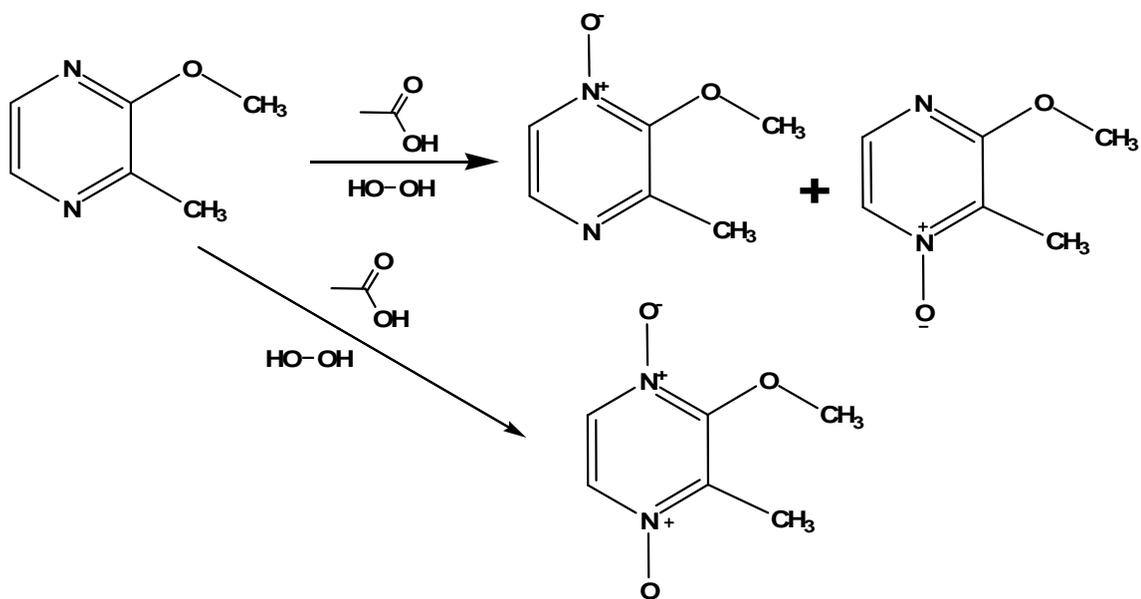
D ležitě je nastavení reak ních podmínek. V našem p ípad se vycházelo ze zkušeností autor Fokse, Bernardiho a Okady<sup>48</sup>. Mezi n pat í teplota, délka zah ívání, množství a koncentrace použitého oxida ního inidla. P i nedo držení podmínek by reakce b žela do druhého stupn , vznikal by tedy dioxid a to není pro další postup vhodné.

Pokud se podíváme blíže na reak ní podmínky, zjistíme, že teplota by se m la pohybovat mezi 80 – 90 °C a doba varu by nem la p ekro ít 8 hodin, p i emž ideální doba varu se nachází mezi 6 – 8 hodinami. Koncentrace oxida ního inidla, kterým pro naše ú ely byl zvolen peroxid vodíku, byla 30%, tedy koncentrovaný roztok. Reak ní prost edí tvo ila koncentrovaná, 99%, kyselina octová.

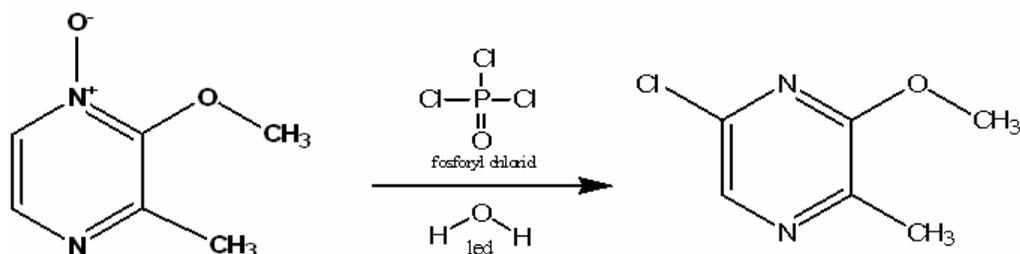
### 4.2.2. Vliv substituent na regioselektivitu oxidace

P i výše zmín é oxida ní reakci se neubráníme vzniku sm sice produkt . Mezi tyto produkty pat í: 1-oxid, 4-oxid a v malém množství (p i dodržení podmínek) i již zmín ěný 1,4-dioxid. Ovšem regioselektivitu N-oxida ní reakce ovliv ují vlastnosti substituent . Obecn lze íci, že oxida ní inidlo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, neatakuje místo s nejv tší

elektronovou hustotou. Je to áste n paradoxní, protože peroxidaci si m žeme p edstavit jako adici elektrofilu (formáln  $\text{OH}^+$ ). Pokud tedy je p ítomen substituent s kladným induk ním efektem (*atomy nebo funk ní skupiny (substituenty), které p itahují vazebné elektrony slab ji než vodík (jsou elektropozitivn jší) a tudíž zvyšují elektronovou hustotu mají kladný induk ní efekt*), který je v našem p ípad zastoupen metylovou skupinou na uhlíku íslo 3, bude se selektivn ji oxidovat dusík vzdálen jší od této skupiny. Podobné zastoupení jednotlivých regioizomer dostáváme, když je pyrazin substituován skupinou se záporným mezomerním efektem (*substituenty, které odebírají elektrony, vykazují záporný mezomerní efekt, obsahují polarizovanou násobnou vazbu, nap .:  $-\text{CH}=\text{O}$ ,  $-\text{RC}=\text{O}$ ,  $-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$ ,  $-\text{C}(\text{OR})=\text{O}$ ,  $-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{O}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{C}=\text{N}$* ). Podobnou vlastnost m žeme pozorovat i u ostatních diazin . Ješt lze podotknout, že methoxy skupina na uhlíku íslo 2 je skupina se záporným induk ním efektem (*Atomy nebo funk ní skupiny (substituenty), které p itahují vazebné elektrony siln ji než vodík (jsou elektronegativn jší) a tudíž snižují elektronovou hustotu mají záporný induk ní efekt*), tudíž bude snižovat elektronovou hustotu na dusíku, a proto by m la zvýšit selektivitu *N*-oxida ní reakce.



## 4.3. Chlorace



### 4.3.1. Význam a získání halogenderivátů

Halogenpyraziny tvoří důležitou skupinu sloučenin, protože umožňují výměnu atomu halogenu za nukleofil u jinak špatně dostupných derivátů pyrazinu. Přitom máme tři možnosti získání halogenderivátů pyrazinového jádra. První způsob je založen na přímé halogenaci pyrazinu v plynné fázi. Druhou metodou je záměna hydroxylové nebo aminoskupiny na pyrazinu halogenem působením chloridu nebo bromidu fosforového. Nejčastějším způsobem získání halogenderivátů je nukleofilní halogenace *N*-oxidu pyrazinu.

### 4.3.2. Podmínky a vliv substituentů na chloraci

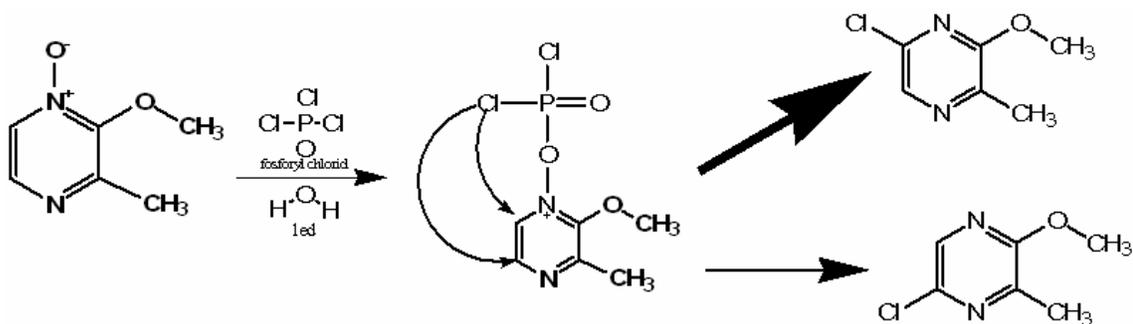
Podmínkou pro dobrou průběh reakce je dobře vysušený výchozí *N*-oxid, protože látky vhodné jako chlorační činidla jsou chlorid thionylu nebo chlorid fosforový a ty jak známo mohou reagovat s vodou za vzniku nebezpečných produktů. I z tohoto důvodu je dobré pracovat s předem vysušenými rozpouštědly, v našem případě nejčastěji toluenem.

Výsledek chlorace závisí na charakteru substituentů. Teoreticky jsou možné 3 produkty chlorace: chlor v poloze 3, 5, 6 pyrazinového jádra. Z důvodu zaplnění polohy 3 methylovou skupinou, pak bude převážně vznikat pyrazinový derivát s chlorem v poloze 6, menší zastoupení bude mít derivát s chlorem v poloze 5.

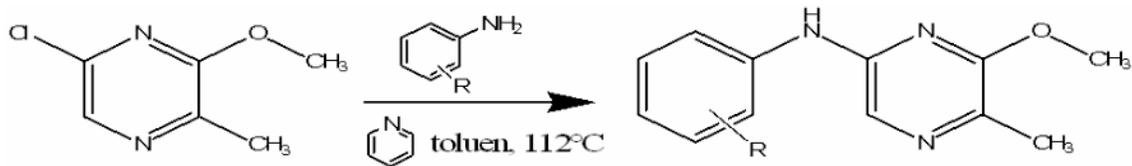
Poznámky z této oblasti shrnul Sato<sup>49</sup>, podle kterého vstup chloru u 2-substituovaného pyrazin-4-oxidu při reakci s chloridem fosforovým je ovlivněn nejen charakterem substituentů, ale i reakční dobou. Kromě reakce 2-aminopyrazin-4-oxidu s chloridem fosforovým je ve všech ostatních případech upřednostněným produktem 2,6-disubstituovaný pyrazin. Současně vznikají různá množství 2,5- a 2,3-disubstituovaných derivátů. U 2-substituovaných pyrazin-4-oxidů substituent s kladným mezomerním efektem potlačí útok atomu chloru na  $\beta$ -uhlík vzhledem k *N*-

oxidovému seskupení a para- k tomuto substituentu. Jako vedlejší produkt vzniká 2,3- disubstituovaný derivát vedle velmi malého množství 2,5- izomeru.

Japonští auto i<sup>50</sup> se zabývali i dalším ovlivněním polohy atomu chloru další skupinou substituent . Substituenty se záporným mezomerním efektem (*substituenty, které odebírají elektrony, vykazují záporný mezomerní efekt, obsahují polarizovanou násobnou vazbu, nap .: -CH=O, -RC=O, -C(OH)=O, -C(OR)=O, -C(NH<sub>2</sub>)=O, -NO<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -C N*) určí u 2-substituovaných pyrazin-4-oxid vstup atomu chloru do polohy 6. Vznikají tak tedy 2,6-substituované pyraziny. Ovšem substituenty s kladným mezomerním efektem (*substituenty, které dodávají do konjugace elektrony, vykazují kladný mezomerní efekt, mají volné elektronové páry, nap .: -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -OR, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -SH, -SR*) řídí vstup atomu chloru do polohy 3, u substituent se slabým kladným mezomerním efektem vzniká směs 2,3- a 2,6-disubstituovaných derivát .



## 4.4. Aminodehalogenace



Jak už bylo popsáno v části o chloraci 2-methoxy-3-methylpyridinu, chlorderiváty umožní relativně snadnou možnost výměny atomu chloru za jiný atom i skupinu, a lze tak získat i tyž přímo získatelné sloučeniny i deriváty. V našem případě se jedná o náhradu atomu chloru za *aminoskupinu* různých substituovaných anilínů.

### 4.4.1. Vliv substituentů na proveditelnost dehalogenací reakce

Snadnost substituce závisí nejen na vlastnostech substituentů pyridinového jádra, ale také na charakteru skupin, které jsou navázané na anilín.

#### 4.4.1.1. Substituce anilínu

Podle praktických zkušeností můžeme říci, že velmi dobře reagují anilíny, které mají v těsné blízkosti *aminoskupiny* skupiny s kladným indukčním efektem, kterou představovala methylová skupina. Skupiny se záporným indukčním efektem i s kladným mezomerním efektem jsou vhodnější v polohách *meta*- nebo *para*- v *aminoskupin* anilínu. Jako zcela nevhodná se jeví substituce silně elektronegativními skupinami, například *trifluormethylovou* skupinou a skupinami se záporným mezomerním efektem, například *nitro* i *nitrilová* skupina. Takové anilíny jsou v našem případě téměř nereaktivní.

#### 4.4.1.2. Substituce pyridinového jádra

Pokud se podíváme na vliv substituentů pyridinu na aminodehalogenací reakci, lze říci, že čím více je aromatické jádro pyridinu aktivováno substituenty (poskytující elektrony do konjugace), tím klesá ochota chlorderivátu poskytovat aminodehalogenací reakci. V našem případě není vliv *methylové* skupiny natolik silný, aby ovlivnil reaktivitu, dále musíme vzít v úvahu i deaktivující vliv *methoxy* skupiny na pyridinové jádro.

## 4.5. Metodika testování

### 4.5.1. Antifungální testování

Nov syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány in vitro na antifungální aktivitu na KBLV FaF UK v Hradci Králové Mgr. Marcelou Vejsovou a paní Idou Dufkovou se spolupracovníky. Antifungální testy probíhaly jako mikrodiluční bujónový test. Jako médium bylo zvoleno RPMI 1640 s glutaminem. Inkubace probíhala 24 a 48 hodin (u kmenu *Trichophyton mentagrophytes* 48 a 72 hodin) při teplotě 35 °C za humidní atmosféry. Prostedí bylo ve tmě, pH zvoleno na 7,0 (pufr MOPS -0,165M). Odeřítání bylo prováděno vizuálně i fotometricky (OD 540 nm). Za minimální inhibiční koncentraci (MIC) se považovala 80% inhibice kontroly (IC<sub>80</sub>).

Mezi testované patogeny patily tyto: *Candida albicans* ATCC44859 (CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

### 4.5.2. Antibakteriální testování

Nov syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány in vitro na antibakteriální aktivitu na KBLV FaF UK v Hradci Králové Mgr. Marcelou Vejsovou a paní Idou Dufkovou se spolupracovníky.

Inkubační metodou byla zvolena mikrodiluční bujónová metoda v destičkách. Jako médium sloužil Mueller - Hinton v bujón. Délka inkubace byla zvolena podobně jako u antifungálních látek 24, respektive 48 hodin při teplotě 37 °C. Způsob inkubace byl statický, ve tmě, za humidní atmosféry při pH 7,0. Vyhodnocení proběhlo jak vizuálně, tak i fotometricky (OD 540 nm). Za MIC byla považována 95% inhibice kontroly.

Mezi testované patogeny patily tyto: *Staphylococcus aureus* CCM4516/08, *Staphylococcus aureus* H 5996/08 (methicilin rezistentní), *Staphylococcus epidermidis* H 6966/08, *Enterococcus sp.* J 14365/08, *Escherichia coli* CCM4517, *Klebsiella pneumoniae* D 11750/08, *Klebsiella pneumoniae* J 14368/08 (ESBL pozitivní), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961.

### 4.5.3. Antivirotické testování

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány in vitro na antivirovou aktivitu v Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit, Leuven, Belgie, Prof. Dr. Lieve Naesens a spolupracovníky.

Cytotoxicita byla testována na buněčných liniích: CRFK (Crandel-Ress feline cells – buňky koňích ledvin), MDCK (Madin Darby canine kidney cells – buňky psích ledvin), HEL, HeLa a Vero. Vždy byla srovnávána s n kterým již zavedeným antivirotickem, které také tvořilo srovnávací kritérium při hodnocení účinnosti.

Mezi tyto srovnávací látky patří: ribavirin, cidofovir, ganciklovir, oseltamivir. Na n kterých buněčných liniích byla testována i minimální cytotoxická koncentrace (=MCC, koncentrace, která vyvolá mikroskopicky zjišitelné změny oproti normální buněčné morfologii).

Mezi virové infekce, v i kterým byla zjišována účinnost, se řadí: *Influenza virus A* (H1N1; H3N2) a *B*, *Herpes simplex virus-1* a *-2*, *Vesicular stomatitis virus*, *Vaccinia virus*, *Parainfluenza-3 virus*, *Reovirus-1*, *Sindbisvirus*, *Coxsackie virus B4*, *Punta Toro virus*, *Respiratory syncytial virus*, *Feline corona virus*, *Feline herpes virus*.

## 5. Experimentální část

### 5.1. Popis a charakterizace jednotlivých látek

Výše popsanými kroky bylo připraveno sedm v literatuře zatím nepopsaných látek, které budou dále podrobněji charakterizovány. Všechny vzorky byly dány na NMR a IR analýzu, která měla potvrdit nebo vyvrátit jejich strukturu. Mezi další metody, které charakterizovaly sloučeniny, patří teplota tání, rozpustnost a lipofilita.

#### 5.1.1. Přístroje a chemikálie

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

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

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

Infračervená spektra byla změřena na přístroji Nicolet Impact 400 na katedře anorganické a organické chemie FaF UK p. Ivou Vencovskou.

$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pro  $^1\text{H}$  a 75,43 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl doc. PharmDr. J. Kuneš, Csc. z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ .

Výpočet lipofility  $\log P$  (logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi *n*-oktanolem a vodou) byl vypočítán užitím programu CS ChemOffice Ultra ver. 9.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.) a ACD/Log P ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc, Toronto, Canada). Hodnoty  $\text{Clog } P$  (logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi *n*-oktanolem a vodou upravený na základě chemických interakcí) byly získány programem CS ChemOffice Ultra ver. 7.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.).

#### 5.1.2. Praktické provedení jednotlivých reakcí

##### 5.1.2.1. N-oxidace

Po proběhlé reakci byla získána žlutá kapalina, ze které se za sníženého tlaku odstranily rozpouštědla a nezreagované výchozí látky. Poté se přidalo malé množství

toluenu a to zp sobilo „vysrážení“ bílého i lehce nažloutlého jemn krystalického produktu, který se odstranil a zbytek íré kapaliny se umístil do exikátoru k vysušení (pot eba suchého produktu vzhledem k dalšímu kroku) a po týdnu byly získány žluté šupinovitě krystaly.

	množství	t.t.	rozpuštnost	To : Ac 1:1	Hex : EtAc 1:1
<b>N,N'-dioxid</b>	2,47 g	181 °C	EtOH, DMSO	0,46	0,19
<b>N-oxid</b>	11,2 g	80 °C	CHCl <sub>3</sub>	0,8	0,6

### 5.1.2.2. Chlorace

Postup p ípravy chlorovaného deriváru byl následující: k p ípravenému N-oxidu se po rozpušt ní v toluenu a po mírném zah átí p ídal po kapkách POCl<sub>3</sub>. Reak ní sm s se pova íla asi 15 – 20 minut (než z ernala) a poté se nechala zchladnout. Po zchladnutí se sm s lila po ástech na led. V této fázi se produkt reakce rozkládal na kone ný chlorid. Následn se odd ílila toluenová a vodná fáze na d ílící nálevce a poté se vodná fáze nechala extrahovat chloroformem. Byl získán nahn dlý, olejovitý chlor derivát.

	Výchozí látka – N- oxid	chlor derivát
Soustava	R <sub>f</sub> VL	R <sub>f</sub> produktu
Hex : EtAc 1:1	0,67	0,683
		0,794
To : Ac 1:1	0,80	0,548
		0,806

### 5.1.2.3. Aminodehalogenace

Aminodehalogena ní reakce probíhala ve vhodném rozpušt dle, nej ast jí toluen, v n kterých p ípadech p ípot eb polárn jšího rozpušt dla zvolen aceton.

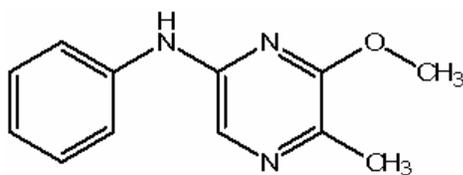
D ležitým krokem bylo p ídání pyridinu k reak ní sm sí, protože p íreakci se uvol uje kyselina chlorovodíková, která by svou aciditou nevhodn ovliv ovala reakci. Jiným ešením by mohlo být použití n kolikanásobn vyšší navážky anilínu, než u ekvimolární navážky pyridinu.

Po prob hlé reakci, jejíž pr b h byl sledován pomocí TLC, se odpa ílo za sníženého tlaku rozpušt dlo a po ochlazení se p ešlo k p e íš ování produktu.

### 5.1.3. Vzorce, názvy a stručný popis finálních sloučenin

#### 5.1.3.1. 6-methoxy-5-methyl-*N*-fenylpyrazin-2-amin

(482/II)



6-methoxy-5-methyl-*N*-fenylpyrazin-2-amin

Byl syntetizován jako první sloučenina pro potvrzení, že dané reakční schéma funguje. Získalo se 45 miligram dané látky, to představuje 4,5% výtěžek. Teplota tání byla stanovena na 149 °C.

Charakteristiky z tenkovrstvé chromatografie jsou uvedeny v tabulce a porovnány v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající 6-methoxy-5-methyl-*N*-fenylpyrazin-2-aminu:

Sumární vzorec C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O

m.h. = 215,11

elementární analýza: teor.: C: 66,96 %; H: 6,09 %; N: 19,52 %; O: 7,43 %

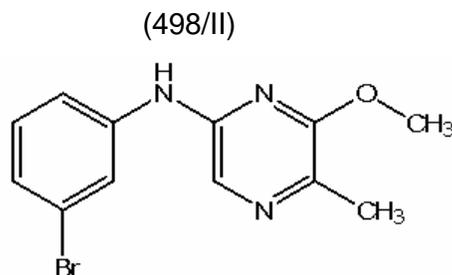
prakt.: C: 67,07 %; H: 5,98 %; N: 19,43 %

IR spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]: 3378 (NH), 3055 (methoxyskupina); 2945 (methyl)  
1600 (fenyl), 1577 (NH), 1398, 1310, 1195 (pyrazin).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO), [τ]: 8,10 (1H, pyr.), 7,26, 7,05, 6,90, 6,86,  
6,72 (5H, arom.), 4,36 (s, NH), 4,05, 3,88.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO), [τ]: 166,25; 151,30; 140,15; 134,96; 130,12;  
129,65; 122,50; 118,82; 118,68; 117,45;  
55,98; 18,65.

### 5.1.3.2. *N*-(3-bromfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin



*N*-(3-bromfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

Bylo získáno 104 mg látky, to znamená 13% výt žek. Teplota tání byla stanovena na 125 °C, látka je dobře rozpustná v CHCl<sub>3</sub>.

Reten ní faktory jsou uvedeny v tabulce a jsou v grafu porovnány s ostatními látkami.

Byla potvrzena struktura odpovídající *N*-(3-bromfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-aminu:

Sumární vzorec C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>3</sub>O

m.h. = 293,02

elementární analýza: teor.: C: 49,00 %; H: 4,11 %; Br: 27,16; N: 14,29 %;  
O: 5,44 %

prakt.: C: 48,87 %; H: 3,98 %; N: 27,13 %

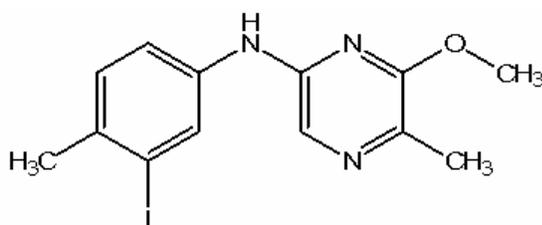
I spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]: 3388 (NH), 3067 (methoxyskupina); 2952 (methyl)  
1601 (fenyl), 1575 (NH), 1397, 1309, 1187  
(pyrazin).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO), [ ]: 8,10 (1H, pyr.), 7,24, 7,10, 6,98, 6,86 (4H, arom.), 4,36 (s, NH), 4,05, 3,88.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO), [ ]: 149,05; 148,93; 142,40; 139,18; 135,06;  
130,45; 123,28; 120,18; 115,51; 111,96;  
53,72; 43,58.

### 5.1.3.3. *N*-(3-jod-4-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

(521/II)



*N*-(3-jod-4-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

Získané množství látky bylo 66,7 mg, což znamená 13,34% výtěžek. Teplota tání byla zjištěna na 122 °C, látka je dobře rozpustná v CHCl<sub>3</sub>.

Charakteristiky z TLC jsou uvedeny v tabulce a pro porovnání jsou uvedeny v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající *N*-(3-jod-4-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-aminu:

Sumární vzorec C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O

m.h. = 355,02

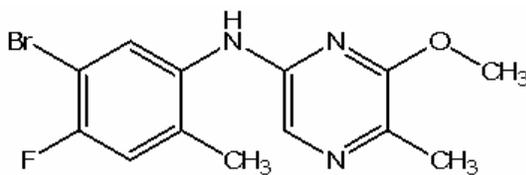
elementární analýza: teor.: C: 43,96 %; H: 3,97 %; I: 35,73 %; N: 11,83 %; O: 4,50 %

prakt.: není dosud k dispozici

IR spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]: 3390 (NH), 3054 (methoxyskupina); 2945 (methyl), 1619 (fenyl), 1597 (NH), 1380, 1307, 1168 (pyrazin).

### 5.1.3.4. *N*-(5-brom-4-fluor-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

(523/II)



*N*-(5-brom-4-fluor-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

Bylo získáno 112,7 mg látky, což představuje 22,54% výtěžek. Teplota tání byla určena mezi 89,2 - 91,8 °C. Látka se dobře rozpouští v DMSO.

Charakteristiky z tenkovrstvé chromatografie jsou uvedeny v tabulce a porovnány v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající *N*-(5-brom-4-fluor-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-aminu:

Sumární vzorec  $C_{13}H_{13}BrFN_3O$

m.h. = 325,02

elementární analýza: teor.: C: 47,87 %; H: 4,02 %; Br: 25,50; N: 12,88 %;  
O: 4,91 %

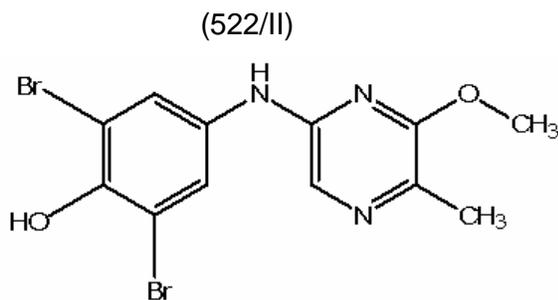
prakt.: C: 48,05 %; H: 3,92 %; N: 25,33 %

I spektrum (KBr),  $[cm^{-1}]$ : 3399 (NH), 3063 (methoxyskupina); 2996 (methyl)  
1611 (fenyl), 1583 (NH), 1475, 1345, 1171  
(pyrazin).

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO),  $[\delta]$ : 8,16 (1H, pyr.), 6,98, 6,86 (2H, arom.), 4,38  
(s, NH), 3,96, 3,78.

$^{13}C$  NMR (75 MHz, DMSO,  $[\delta]$ ): 166,70; 155,36; 149,05; 139,16; 135,96;  
131,40; 123,57; 120,16; 115,72; 111,91;  
53,71; 43,52; 18,82.

### 5.1.3.5. 2,6-dibromo-4-(6-methoxy-5-methylpyrazin-2-ylamino)fenol



2,6-dibromo-4-(6-methoxy-5-methylpyrazin-2-ylamino)fenol

Výtěžek reakce byl 36 %, tomu odpovídá 216 mg. Teplota tání je 158 °C. Látka je částečně rozpustná v  $CHCl_3$  a dobře rozpustná v DMSO.

Charakteristiky z tenkovrstvé chromatografie jsou uvedeny v tabulce a porovnány v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající 2,6-dibromo-4-(6-methoxy-5-methylpyrazin-2-ylamino)fenolu:

Sumární vzorec  $C_{12}H_{11}Br_2FN_3O_2$

m.h. = 386,92

elementární analýza: teor.: C: 37,05 %; H: 2,85 %; Br: 41,08; N: 10,80 %; O:  
8,23 %

prakt.: C: 37,06 %; H: 2,82 %; N: 10,63 %

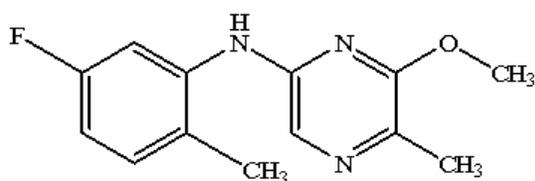
I spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]: 3379 (NH), 3266 (methoxyskupina); 2926 (methyl)  
1608 (fenyl), 1561 (NH), 1481, 1361, 1172  
(pyrazin).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]: 8,18 (1H, pyr.), 6,86, 6,78 (2H, arom.), 5,46  
(OH); 4,26 (s, NH), 3,98, 2,49.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO), [δ]: 158,04; 144,34; 144,26; 143,60; 140,99;  
139,64; 135,64; 117,34; 115,86; 113,88;  
53,80; 43,98.

### 5.1.3.6. *N*-(5-fluoro-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methyl pyrazin-2-amin

(577/II)



*N*-(5-fluoro-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

Velikost výt žku u této látky byla 20,48 %, to znamená 102,4 mg látky. Teplota  
tání byla zm ěna na 132 °C. Látka se áste n rozpoušt ěla v DMSO a dob ě se  
rozpoušt ěla v CHCl<sub>3</sub>.

Charakteristiky z tenkovrstvé chromatografie jsou uvedeny v tabulce a  
porovnány v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající *N*-(5-fluoro-2-methylfenyl)-6-methoxy-5-  
methylpyrazin-2-aminu.

Sumární vzorec C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O

m.h. = 247,11

elementární analýza: teor.: C: 63,15 %; H: 5,71 %; F: 7,68; N: 16,99 %;

O: 6,47 %

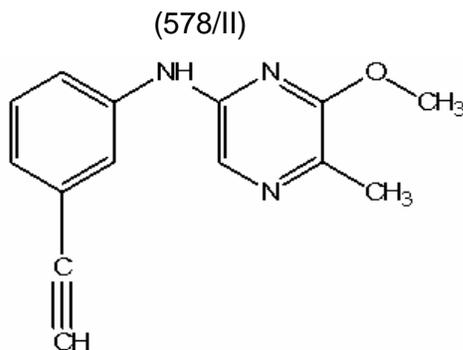
prakt.: C: není dosud k dispozici

I spektrum (KBr), [cm<sup>-1</sup>]: 3413 (NH), 3058 (methoxyskupina); 2918 (methyl)  
1659 (fenyl), 1595 (NH), 1474, 1396, 1194  
(pyrazin).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO), [δ]: 8,10 (1H, pyr.), 7,22, 7,00, 6,40 (3H,  
arom.), 4,40 (s, NH), 4,04 (3H), 2,20 (3H),  
1,14 (3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO, [ ]): 164,41; 161,23; 157,78; 147,09; 142,60;  
139,10; 135,15; 130,48; 117,66; 102,66;  
97,69; 43,69; 16,83.

### 5.1.3.7. *N*-(3-ethynylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin



*N*-(3-ethynylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-amin

Celkové množství bylo 135,5 mg, to znamená celkový výtěžek 13,55 %. Teplota tání byla určena na 119 °C. Látka byla částečně rozpustná v DMSO a dobře v  $\text{CHCl}_3$ .

Charakteristiky z tenkovrstvé chromatografie jsou uvedeny v tabulce a v grafu.

Byla potvrzena struktura odpovídající *N*-(3-ethynylfenyl)-6-methoxy-5-methylpyrazin-2-aminu:

Sumární vzorec  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$

m.h. = 239,11

elementární analýza: teor.: C: 70,28 %; H: 5,48 %; N: 17,56 %; O: 6,69 %

prakt.: C: není dosud k dispozici

IR spektrum (KBr),  $[\text{cm}^{-1}]$ : 3411 (NH), 3237 (methoxyskupina); 3061 (ethynyl); 2948 (methyl) 1600 (fenyl), 1574 (NH), 1495, 1382, 1104 (pyrazin).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO), [ ]: 8,10 (1H, pyr.), 7,25, 7,10, 6,88, 6,50 (4H, arom.), 4,38 (s, NH), 4,04 (3H), 3,01 (3H), 1,10 (1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO, [ ]): 157,80; 147,51; 142,69; 139,09; 135,08;  
129,22; 129,13; 122,66; 121,38; 116,01;  
114,20; 84,29; 53,69; 43,69.

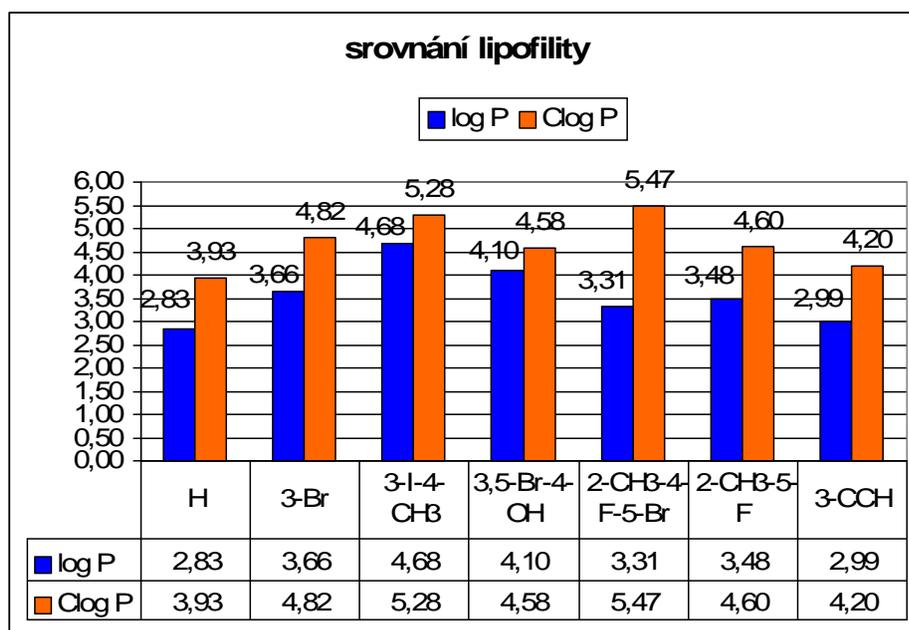
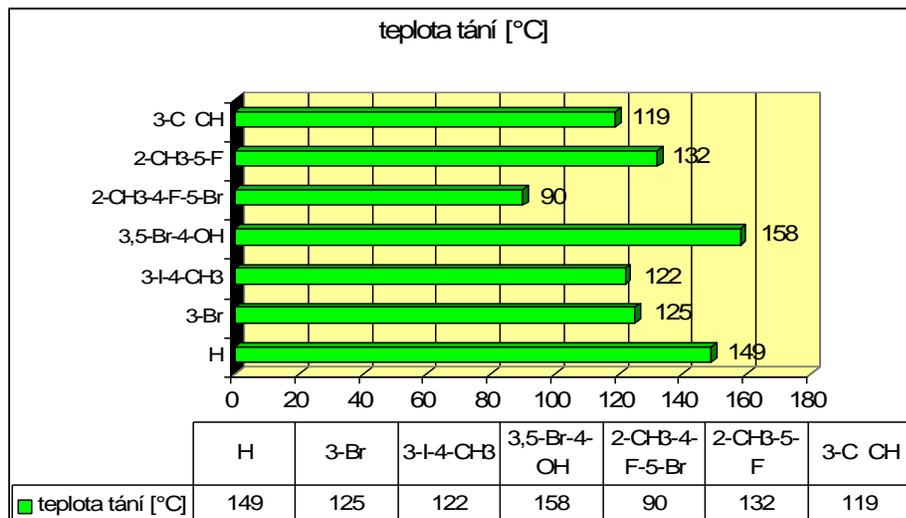
## 5.1.4. Tabulková část popisující vlastnosti jednotlivých látek

Ozna ení	R	množství / výt žek [mg] / [%]	Rozpustnost
482/II	H	45 / 4,5	CHCl <sub>3</sub> +
498/II	3-Br	104 / 13	CHCl <sub>3</sub> +
521/II	3-I-4-CH <sub>3</sub>	66,7 / 13,34	CHCl <sub>3</sub> +
522/II	3,5-Br-4-OH	216 / 36	DMSO +; CHCl <sub>3</sub> ±
523/II	2-CH <sub>3</sub> -4-F-5-Br	112,7 / 22,54	DMSO +
577/II	2-CH <sub>3</sub> -5-F	102,4 / 20,48	CHCl <sub>3</sub> +; DMSO ±
578/II	3-C CH	135,5 / 13,55	CHCl <sub>3</sub> +; DMSO ±

dob e rozpustný +  
áste n rozpustný ±

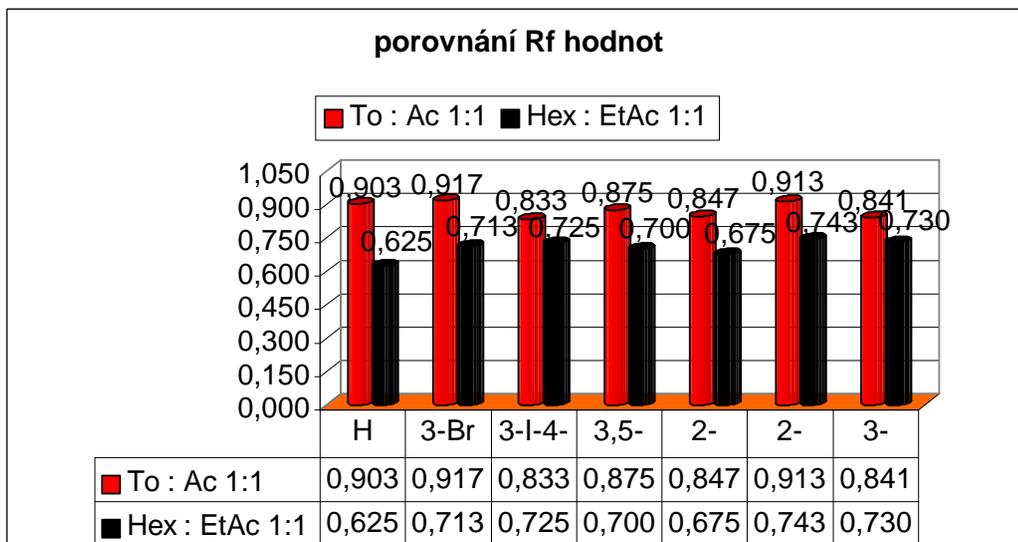
ozna ení	R	Teplota tání [°C]	istota [%]
482/II	H	149	96,41
498/II	3-Br	125	91,09
521/II	3-I-4-CH <sub>3</sub>	122	nej.
522/II	3,5-Br-4-OH	158	88,85
523/II	2-CH <sub>3</sub> -4-F-5-Br	89,2 - 91,8	95,62
577/II	2-CH <sub>3</sub> -5-F	132	95,72
578/II	3-C CH	119	88,68

Ozna ení	R	log P ACD / Log P	log P / Clog P
482/II	H	3,49 ± 0,46	2,83 / 3,93315
498/II	3-Br	4,70 ± 0,54	3,66 / 4,81858
521/II	3-I-4-CH <sub>3</sub>	4,90 ± 0,50	4,68 / 5,27758
522/II	3,5-Br-4-OH	5,55 ± 0,62	4,1 / 4,58263
523/II	2-CH <sub>3</sub> -4-F-5-Br	5,52 ± 0,61	4,31 / 5,46843
577/II	2-CH <sub>3</sub> -5-F	3,92 ± 0,50	3,48 / 4,59758
578/II	3-C CH	3,16 ± 0,50	2,99 / 4,20315



		Soustava			
		To : Ac 1:1		Hex : EtAc 1:1	
ozna ení	R	elo	7,2	elo	8,0
		vzdálenost od po átku	R <sub>f</sub>	vzdálenost od po átku	R <sub>f</sub>
482/II	H	6,5	0,903	5,0	0,625
498/II	3-Br	6,6	0,917	5,7	0,713
521/II	3-1-4-CH <sub>3</sub>	6,0	0,833	5,8	0,725
522/II	3,5-Br-4-OH	6,3	0,875	5,6	0,700
523/II	2-CH <sub>3</sub> -4-F-5-Br	6,1	0,847	5,4	0,675

ozna ení	R	elo	6,9	elo	7,4
		vzdálenost od po átku	R <sub>f</sub>	vzdálenost od po átku	R <sub>f</sub>
577/II	2-CH <sub>3</sub> -5-F	6,3	0,913	5,5	0,743
578/II	3-C CH	5,8	0,841	5,4	0,730



## 5.2. Biologické hodnocení látek

### 5.2.1. Antifungální hodnocení

#### 5.2.1.1. Výsledky antifungálních test

sloučenina - MIC / IC<sub>80</sub> ( μmol \* ml<sup>-1</sup>)

		498/II	521/II	522/II	523/II	577/II	578/II
CA	24h	> 125	> 125	125	250	> 250	> 500
	48h	> 125	> 125	500	500	> 250	> 500
CT	24h	125	125	500	500	> 250	> 500
	48h	> 125	125	> 500	> 500	> 250	> 500
CK	24h	> 125	125	250	250	> 250	> 500
	48h	> 125	125	250	> 500	> 250	> 500
CG	24h	> 125	125	500	250	> 250	> 500
	48h	> 125	125	> 500	500	> 250	> 500
TB	24h	125	125	250	250	> 250	> 500
	48h	> 125	> 125	500	500	> 250	> 500
AF	24h	> 125	125	500	> 500	> 250	> 500
	48h	> 125	> 125	> 500	> 500	> 250	> 500
AC	24h	> 125	> 125	500	> 500	> 250	> 500
	48h	> 125	> 125	> 500	> 500	> 250	> 500
TM	72h	> 125	125	125	500	> 250	> 500
	120h	> 125	> 125	125	500	> 250	> 500

testované kmeny:

CA 1 - Candida albicans ATCC 44859

CT - Candida tropicalis 156  
 CK 2 - Candida crusei E28  
 CG - Candida glabrata 20/I  
 TB - Trichosporon beigeli 1188  
 AF - aspergillus fumigatus 231  
 AC - Absidia corymbifera 272  
 TM - Trichophyton mentagrophytes 445

## 5.2.2. Antibakteriální hodnocení

Ti látky byly otestovány na antibakteriální účinnost vůči vybraným patogenům.  
 Konkrétně to jsou látky 522/II, 577/II a 578/II.

### 5.2.2.1. Výsledky antibakteriálních testů

		sloučenina - MIC / IC <sub>80</sub> (μmol * ml <sup>-1</sup> )		
		522/II	577/II	578/II
SA	24h	250	>500	>500
	48h	250	>500	>500
MRSA	24h	250	>500	>500
	48h	250	>500	>500
SE	24h	250	>500	>500
	48h	250	>500	>500
EF	24h	500	>500	>500
	48h	500	>500	>500
EC	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
KP-E	24h	>500	>500	>500
	48h	>500	>500	>500
PA	24h	<b>31,25</b>	>500	>500
	48h	<b>31,25</b>	>500	>500

testované kmeny:

SA – Staphylococcus aureus CCM4516/08

MRSA - Staphylococcus aureus H 5996/08  
 methicilin rezistentní

SE – Staphylococcus epidermidis H 6966/08

EF - Enterococcus sp. J 14365/08

EC - Escherichia coli CCM4517

KP - Klebsiella pneumoniae D 11750/08

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

PA - Pseudomonas aeruginosa CCM 1961

## 5.2.3. Antivirotické hodnocení

### 5.2.3.1. Výsledky antivirotických test

sloučenina	jednotka koncentrace	min. cytotoxic concentration	EC <sub>50</sub>		
			Vesicular stomatitis virus	Coxsackie virus B4	Respiratory syncytial virus
521/II	µg/ml	20	> 20	> 20	> 20
523/II	µg/ml	> 100	<b>12</b>	> 100	> 100
standard					
ribavirin	µM	> 250	<b>6</b>	146	22

cytotoxicita testována na buněčné kultuře HeLa cells

sloučenina	jednotka koncentrace	CC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	
			Feline corona virus	Feline herpes virus
521/II	µg/ml	12,3	> 4	> 4
523/II	µg/ml	56,5	> 20	> 20
standard				
ganciklovir	µM	> 100	> 100	2,6

cytotoxicita zjišťována na CRFK buněčné kultuře;  
CRFK = Crandell - Rees Feline Kidney cells

sloučenina	jednotka koncentrace	min. cytotoxická koncentrace	EC <sub>50</sub>			
			Herpes simplex virus - 1	Herpes simplex virus - 2	Vaccinia virus	Vesicular stomatitis virus
521/II	µg/ml	100	> 20	> 20	> 20	> 20
523/II	µg/ml	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
standard						
ribavirin	µM	> 250	50	> 250	> 250	> 250
cidofovir	µM	> 250	1	1	6	> 250
ganciklovir	µM	> 100	0,02	0,09	> 100	> 100

cytotoxicita ověřována na buněčné kultuře HEL cells

sloučenina	jednotka koncentrace	min. cytotoxická koncentrace	EC <sub>50</sub>			
			Para-influenza virus	Reovirus - 1	Coxsackie virus B4	Punta Toro Virus
521/II	µg/ml	100	> 20	> 20	> 20	> 20
523/II	µg/ml	100	> 100	> 100	> 100	> 100
standard						
ribavirin	µM	> 250	50	> 250	> 250	112

cytotoxicita testována na kultu e Vero cells

sloučenina	jednotka koncentrace	Cytotoxicita		EC <sub>50</sub>		
		CC <sub>50</sub>	MCC	Influenza A/H1N1	Influenza A/H3N2	Influenza B
521/II	µg/ml	45,3	20	N.A.	N.A.	N.A.
523/II	µg/ml	> 100	> 100	N.A.	N.A.	N.A.
standard						
oseltamivir	µM	> 100	> 100	12	20	2
ribavirin	µM	> 100	> 100	9	9	7

cytotoxicita testována na buněné kultu e MDCK = Madin Darby Kidney cells

## 6. Diskuze

### 6.1. Syntéza

Po provedení *N*-oxidací reakce pyrazinového jádra jsme zjistili, že smíslený produkt při reakci opravdu vzniká. To nám dokazuje provedená TLC, která odhalila smíslený produkt, u kterých byly následně zjištěny zcela odlišné fyzikální vlastnosti, ale například i vzhled. Tento mechanismus je blíže popsán v kapitole 4.2.1. a 4.2.2. metodické části a je zcela prozíravý.

Obě látky, *N*-oxid a *N,N'*-dioxid, se od sebe lišily fyzikálními vlastnostmi: zatímco *N,N'*-dioxid při t.t. 181 °C, byl rozpustný v EtOH a DMSO, jeho  $R_f = 0,46$  v soustavě To : Ac 1:1, 0,19 v soustavě Hex : EtAc 1:1. *N*-oxid při t.t. 80 °C, byl rozpustný v CHCl<sub>3</sub> a  $R_f = 0,8$  v soustavě To : Ac 1:1, 0,6 v soustavě Hex : EtAc 1:1. Získané množství *N*-oxidu bylo 11,2 gramu, to znamená asi 44,8 % výtěžek; mnohem menší výtěžek byl u dioxidu, který činil 2,47 gramu. Tento rozdíl ve výtěžnosti je dán specificky zvolenými podmínkami (blíže uvedeny v kapitole 2.1. metodické části), které byly omezeny vznik nežádoucího *N,N'*-dioxidu. Co se týče vzhledu, *N,N'*-dioxid má charakter bílého i lehce nažloutlého jemně krystalického produktu. *N*-oxid má vzhled žlutých šupinovitých krystalů.

0,52 molu VL<sup>1</sup> ..... 5,5 molu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4,5 molu CH<sub>3</sub>COOH  
navážka 25 g VL ..... 72 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 103,8 g CH<sub>3</sub>COOH  
tomu odpovídá 0.20 molu VL ..... 2,11 molu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 1,73 molu CH<sub>3</sub>COOH

	množství	t.t.	rozpustnost	To : Ac 1:1	Hex : EtAc 1:1
<b><i>N,N'</i>-dioxid</b>	2,47 g	181 °C	EtOH, DMSO	0,46	0,19
<b><i>N</i>-oxid</b>	11,2 g	80 °C	CHCl <sub>3</sub>	0,8	0,6

Po provedené chloraci je nutné produkt a nezreagovaný POCl<sub>3</sub> rozložit vodou. Při tomto úkonu se silně uvolňuje teplo, proto je nutné celou směs chladit tak, aby teplota nepřesáhla 50 °C. Používá se led.

Na TLC bylo patrné, že chlorderivát není jednotný. Tento jev je opět zcela prozíravý. Jeho příčinou je substituce pyrazinového jádra, která ovšem upravením jeden z možných produktů. Na TLC byla sice patrná jedna skvrna, která ovšem vykazovala „vnitřní“ rozdělení.  $R_f$  chlor derivátu byl v soustavě Hex : EtAc 1:1 0,794 a v druhé dle soustavě To : Ac 1:1 0,548. Získané množství chlorovaného derivátu

<sup>1</sup> 2-methoxy 3-methylpyrazin

byly přibližně 4 gramy, z toho vyplývá asi 40% výtěžek. Dále v tabulce můžeme vidět zbytek výchozího N-oxidu. Produkt chlorace byl olejovitý a nahradil.

0,178 molu N – oxidu (140,1 g/mol) ..... 0,88 molu POCl<sub>3</sub> (153,3 g/mol)  
 navážka 10 g N – oxidu ..... 53,66 g POCl<sub>3</sub> = 32,62 ml  
 odpovídá 0,07 molu N – oxidu ..... 0,35 molu POCl<sub>3</sub> (1,645 g/cm<sup>3</sup>)

	výchozí látka – N- oxid	chlor derivát
Soustava	R <sub>f</sub> VL	R <sub>f</sub> produktu
Hex : EtAc 1:1	0,67	0,683
		0,794
To : Ac 1:1	0,80	0,548
		0,806

Dalším krokem byla aminodehalogenace reakce. Podle zvoleného typu rozpouštědla se zvolila i teplota, při které reakce probíhala. Při použití toluenu byla teplota přibližně 112 °C, pokud byl zvolen aceton, byla teplota nižší (nižší teplota varu).

V kapitole 4.4.2. metodické části je jmenována důležitá součást reakce směsi, která se používá k neutralizaci kyseliny chlorovodíkové, která vzniká při této reakci. A to pyridin. Jako druhou možnost lze využít několikanásobnou navážku anilínu. Nevýhoda tohoto postupu je následné zdlouhavé přečištění produktu. Je pravdou, že při použití pyridinu nám také vzniká vedlejší produkt, pyridinium-chlorid. Je to pevný jemný krystalický prášek, který má tmavě červenou barvu. Je to ovšem předpokládána nečistota, narozdíl od použití anilínu, kdy nemůžeme předvídat vznik vedlejších produktů.

Co se týče navážek, vycházelo se z navážky 0,5 gramu chlorovaného pyrazinového derivátu, to odpovídá 0,003 mol. Podle molárního množství chlorovaného pyrazinu se toto množství ekvimolárně odpovídá pro použité anilíny a pyridin.

Všechny látky byly čištěny jednotným postupem. Zvolený postup spočíval v přidání menšího množství ethanolu a použití aktivního uhlí jako sorbentu, které na své dostatečně velké povrchy adsorbují případné nečistoty. Následovala filtrace za tepla. Po filtraci se použila metoda krystalizace ze směsi rozpouštědel ethanol:voda, doplněná ochlazením.

## 6.2. Vlastnosti látek

Pokud se blíže podíváme na jednotlivé látky, byly u nich sledovány určité parametry. Mezi nimi lze za aditivní lipofilitu (prezentovanou  $\log P$ ,  $\text{Clog } P$ ), teplotu tání, rozpustnost, výtěžnost reakcí,  $R_f$  hodnoty.

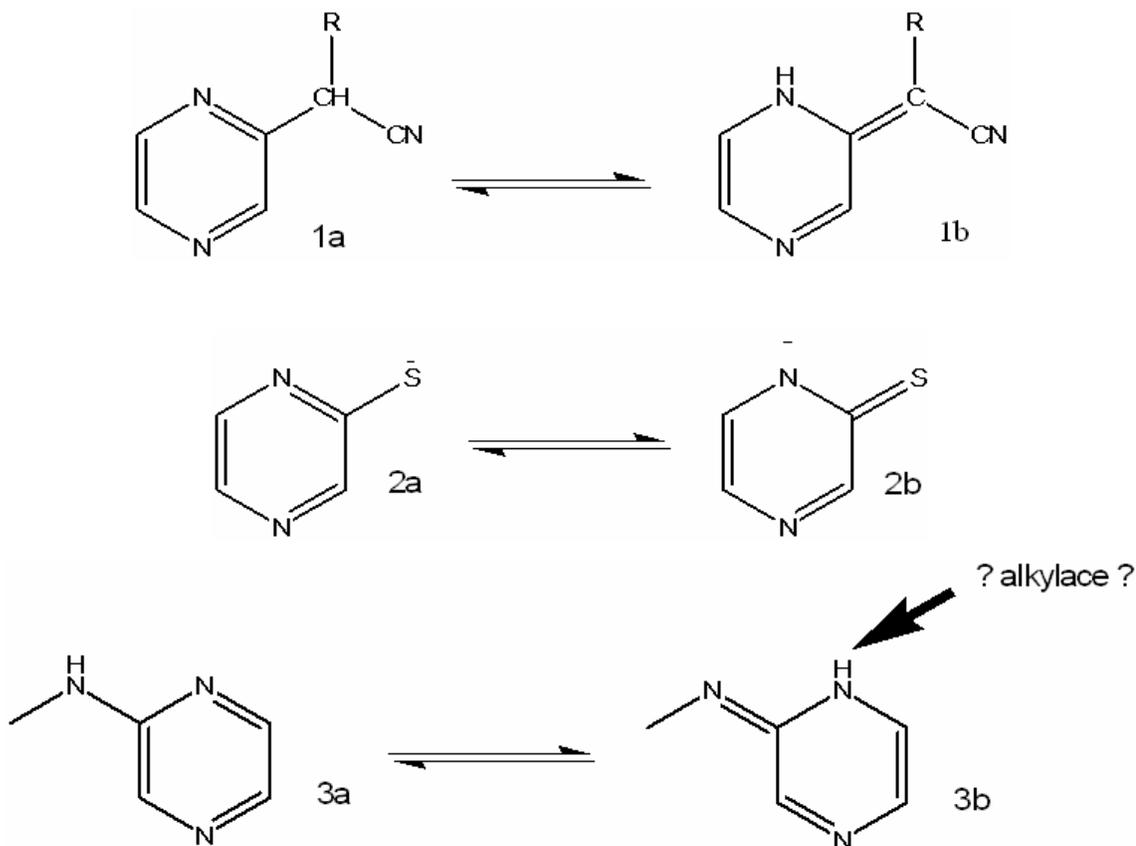
Lipofilita je velmi důležitý parametr. Ovlivňuje nám rozpustnost ve vodě, napovídá, jestli bude látka schopna přechodu přes lipoproteinovou membránu buňky. K ukazatelům lipofility nám slouží  $\log P$ ,  $\text{Clog } P$ . Hodnota  $\text{Clog } P$  je rozdělovací koeficient oktanol/voda, při jehož určení jsou vzaty v potaz možné chemické interakce. Hodnota  $\log P$  je rozdělovací koeficient v soustavě *n*-oktanol/voda. Hodnota lipofility je též významný parametr pro predikci prostupu nově syntetizovaných látek přes mykobakteriální stěnu. Optimální hodnoty se u podobných pyrazinových derivátů připravených v minulosti pohybovaly v rozmezí  $\log P = 2,0 - 3,0$ <sup>50</sup>.

$R_f$  hodnoty a teplota tání jsou kvalitativní hodnoty jednotlivých látek. Rozpustnost je parametr, který napomáhá při testování a při kvalitativních testech (NMR a IR spektra). Všechny sloučeniny byly alespoň částečně rozpustné v EtOH, dále se zkoušela rozpustnost v DMSO a  $\text{CHCl}_3$ .

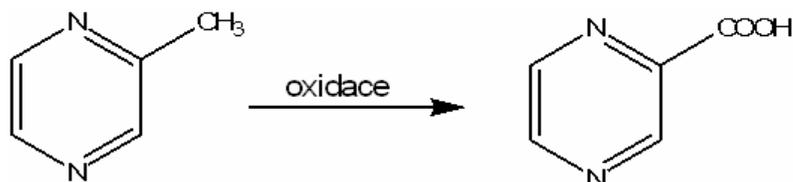
Co se týká výtěžnosti reakcí, můžeme uvést látku 522/II, u které byl výtěžek nejvyšší a to 36 %, to znamená asi 216 mg. Látka 578/II byla syntetizována navzájem, dle vodem k tomuto postupu bylo nedostatečné množství látky při první syntéze. Celkový výtěžek byl 135,5 mg, to činí 13,55 %. Výtěžek se nejvýše pohyboval kolem 13 %, vyšší výtěžnost byla u látek 523/II a 577/II, a to okolo 20 %.

## 6.3. Mechanismus úinku

Co se týká mechanismu úinku, tak ten nebyl objasněn. Pouze byl pokus o jeho navrnutí. O mechanismu úinku těchto derivátů pyrazinu se můžeme pouze dohadovat. Přesto lze navrhnout dvě varianty, které ovšem nejsou nijak podloženy ani potvrzeny. Prvou variantou je možná tautomerie na pyrazinovém jádře při vhodné substituci jádra. Například pyrazinylová (**1a**) a pyrazylydenová (**1b**) tautomerie u sloučenin, které mají methylenovou skupinu substituovanou zároveň nitrilovou a karboxylovou skupinou.<sup>51</sup> Podobně jako dusíkaté heterocykly, které mají v 2-poloze hydroxylovou<sup>52</sup> nebo merkaptopyrazin<sup>53</sup> (**2a**, **2b**), které lze znázornit analogickými strukturami. Podobně můžeme fungovat tautomerie i v našem případě, kde navíc můžeme probíhat alkylace na jednom z dusíků cyklu (**3a**, **3b**).



Druhou možností je in vivo oxidace postranní methylové skupiny p i metabolismu a tím pádem vznik karboxylové skupiny.



Co se týká mechanismu účinku látek působících antivirov, mohl vyplývat z tautomerie popsané výše. Mohlo by se jednat o narušení syntézy nukleové kyseliny viru, vložením chybné baze, jelikož pyrazin si můžeme představit jako analog pyrimidinu, který tvoří pyrimidinové baze nukleových kyselin.

## 6.4. Výsledky biologického hodnocení

Výsledky antifungálních testů dopadly následovně. Podle výsledků testů jednotlivých látek na katedře biologických a lékařských věd bylo zjištěno následující.

Je třeba, že látky postrádají karboxylovou funkci, která se zdála být jednou z podstatných funkcí pyrazinových derivátů proti houbovým organismům, vykazují látky antimykotickou aktivitu proti následujícím patogenům: *Candida albicans* ATCC44859

(CA), *Candida tropicalis* 156 (CT), *Candida krusei* E28 (CK), *Candida glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon beigeli* 1188 (TB), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Absidia corymbifera* 272 (AC), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

Výsledná aktivita nebyla vysoká, lze jí označit jako střední, u níž některých látek jako nižší střední aktivita. Nejširší spektrum měla látka 521/II s MIC 125 μmol.l<sup>-1</sup>. Naopak specifitější látkou se jevila látka 498/II, která svojí nejvyšší účinností vykazovala proti CT a TB s MIC také 125 μmol.l<sup>-1</sup>. U některých kmenů nebyla bezpodmínečná aktivita ani u látky 523/II.

Ti látky byly otestovány na antibakteriální účinnost v šesti vybraným patogenům. Konkrétně to jsou látky 522/II, 577/II a 578/II.

Výsledky antibakteriálních testů vcelku jasně ukázaly, že dané látky jsou neúčinné na bakteriální patogeny. Přesto látka 522/II vykazovala vcelku zajímavou aktivitu v šesti *Pseudomonas aeruginosa*. Její MIC byla 31,25 μmol.l<sup>-1</sup>.

Na antivirotickém testování byly pouze dvě látky a to látka 521/II a 523/II. Testování proběhlo v laboratořích v Belgii. Sloučeniny byly testovány na cytotoxicitu na několika druzích buněk (jako hodnotící kritérium se používalo CC<sub>50</sub> (=cytotoxicity concentration) – koncentrace, kdy v 50% případů dojde k zaznamatelné poruše vývoje) a také byla testována účinnost proti několika virovým patogenům, kde byla jako hodnotící kritérium použita EC<sub>50</sub> (= effective concentration, koncentrace, při které klesne patogenita viru na polovinu).

Lze říci, že v šesti případech chřipky (*Influenza virus A* (H1N1; H3N2) a *B*) jsou testované látky naprosto neúčinné. A už v nejvyšší možné koncentraci nebo v koncentraci, která ještě není toxická. Srovnávací látkou v tomto případě byl oseltamivir a ribavirin.

Při testování aktivity proti následujícím patogenům: *Parainfluenza-3 virus*, *Reovirus-1*, *Sindbisvirus*, *Coxsackie virus B4*, *Punta Toro virus*, kde porovnávací látkou byl ribavirin (jeho účinek na zmíněné patogeny nebyl nijak vysoký), by se dal účinek porovnat jako středně silný.

Na další sérii patogenů (*Coxsackie virus B4*, *Respiratory syncytial virus*) byla účinnost taktéž střední. Srovnávací látkou byl opět ribavirin.

Proti herpetickým infekcím (*Herpes simplex virus-1 a -2*) a *Vaccinia virus* byla účinnost rovněž středně silná, ovšem v této skupině máme spolehlivé látky v terapii a jako porovnávací vzorky sloužili ribavirin, cidofovir a ganciclovir.

V další sérii se zkoumala účinnost proti *Feline corona virus* a *Feline herpes virus*. Nalezené údaje byly nadřadné, ale jejich sílu snižoval fakt, že výsledky

cytotoxicity byly příliš nízké, tudíž by docházelo k projevu toxicity již v terapeutických hladinách.

Jediným opravdu nadřazeným výsledkem bylo působení látky 523/II proti *Vesicular stomatitis virus*. Jak výsledky cytotoxicity, tak míra účinku byly proti porovnávací látce (ribavirin) nadřazené. Látka byla pouze dvakrát slabší než ribavirin! Výsledky látky 521/II nebyly nadřazené, ale jejich hodnotu snížil stejný fakt, jako v předchozím odstavci (relativně vysoká cytotoxicita).

## 7. Závěr

Závěrem mohu říci, že bylo připraveno sedm zcela nových sloučenin ze skupiny derivát pyrazinu, konkrétně derivát 2-methoxy-3-methylpyrazinu. Tyto látky byly popsány pomocí teploty tání, retenčních faktorů, rozpustnosti, lipofility, pomocí spekter z nukleární magnetické rezonance a IR.

U látek byla zkoumána biologická aktivita proti patogenním mykózám, patogenním bakteriím a virům, kteří parazitují na savčích buňkách. Výsledky testů prokázaly účinnost proti těmto pro člověka škodlivým organismům. Síla účinku se sice lišila u jednotlivých sloučenin, ale stručně můžeme říci, že například vodce mykóz má středně silný účinek. Antibakteriálně nebyly sloučeniny aktivní, pouze u látky 522/II byla aktivita proti kmenu *Pseudomonas aeruginosa* slibná. Antivirová aktivita se lišila kmen od kmenu, protože byla nalezena nad jiná sloučenina (523/II) proti *Vesicular stomatitis virus*, která měla pouze poloviční účinnost než zavedené antivirotikum ribavirin.

Snahou bylo také zamyšlení se nad možnými mechanismy účinku. U hypotéz není možnost ověření ani jedné z teorií, proto se musí brát s určitým nadhledem.

Protože se jedná o látky bez karboxylové skupiny, bylo by zajímavé porovnat jejich účinek na bakteriální kmeny způsobující tuberkulózu s látkami, které tuto skupinu mají. Vzorky nasyntetizovaných sloučenin byly odeslány na ústav TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility), USA. Výsledky nejsou zatím známy, budou součástí uvažované navazující rigorózní práce v příštím roce.

## 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., str 377.*
- 2 McCullough, K. J. Pyrazines and Related Ring Structures. Ansell M.F. *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds. Elsevier, New York. 1995, 2nd edition, Vol. IV, s. 93–130.*
- 3 Brown, D.J. The Pyrazines. Supplement 1. *J. Wiley & Sons, New York, 2002, str. 576.*
- 4 Doležal, M.: Pyraziny syntetického a přírodního původu. Sborník 39. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, Nymburk, 26. až 28. listopadu 2004, *Chem. Listy, 2004, 98, 1006.*
- 5 Maga, J.A. Pyrazine update. *Food Rev. Inter, 1992, 8, 479-558.*
- 6 Mattia, A.; Renwick, A.G.; Sipes, I. G. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser., 2007, 947, 1–225.*
- 7 Ozdemir, A.; Turan-Zitouni, G.; Kaplancikli, Z.A.; Tunali, Y. Synthesis and biological activities of new hydrazide derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem, 2008, 29:1.*
- 8 Palek, L.; Dvůrák, J.; Svobodová, M.; Buchta, V.; Jampílek, J.; Doležal, M. Synthesis, antimycobacterial and antifungal evaluation of 3-arylaminopyrazine-2,5-dicarbonitriles. *Arch Pharm (Weinheim), 2008, 341(1), 61-5.*
- 9 Yamamoto, S.; Toida, I.; Watanebe, N.; Ura, T. In vivo antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs: results of screening tests. *Kekkoku, 1996, 71(3), 253–8.*
- 10 Yamamoto, S.; Toida, I.; Watanebe, N.; Ura, T. In vivo antimycobacterial activities of pyrazinamide analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy, 1995, 2088–2091.*
- 11 Doležal, M.; Palek, L.; Vinsova, J.; Buchta, V.; Jampílek, J.; Kralova, K. Substituted pyrazinecarboxamides: synthesis and biological evaluation. *Molecules, 2006, 11(4), 242-56.*
- 12 Doležal, M.; Cmeldova, P.; Palek, L.; Vinsova, J.; Kunes, J.; Buchta, V.; Jampílek, J.; Kralova, K. Synthesis and antimycobacterial evaluation of substituted pyrazinecarboxamides. *Eur J Med Chem, 2008, 43(5), 1105-13.*
- 13 Doležal, M.; Jampílek, J.; Osicka, Z.; Kunes, J.; Buchta, V.; Víchová, P. Substituted 5-arylpyrazine-2-carboxylic acid derivatives: synthesis and biological activity. *Farmaco, 2003, 58(11), 1105–11.*
- 14 Jampílek, J.; Doležal, M.; Buchta V. Antimicrobial evaluation of some arylsulfonylpyrazinecarboxylic acid derivatives. *Med Chem, 2007, 3(3), 277 – 80.*
- 15 Wu, X.A.; Zhao, Y.M.; Yu, N.J. A novel analgesic pyrazine derivative from leaves of *Croton tiglium* L. *Journal of Asian Natur Products Research, 2007, 9(5), 451 – 5.*
- 16 Mihara, T.; Iwashita, A.; Matsuoka, N. A novel adenosine A(1) and A(2A) receptor antagonist ASP5854 ameliorates motor impairment in MPTP-treated marmosets: comparison with existing anti-Parkinson's disease drugs. *Behav Brain Res., 2008, 194(2), 152-61.*
- 17 Connolly, M.A.; Chaulet, P.; Raviglione, M.C. Epidemiology of Tuberculosis. *Eur Respir Mon, 1997, 4, 51–67.*
- 18 Crofton, J.; Horne, N.; Miller, F. Clinical Tuberculosis. *London and Basigstoke Macmillan Education LTD, 1992, 210s.*
- 19 Hartl, J. a kolektiv. Farmaceutická chemie IV, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2006, str. 119.
- 20 Hrdina R., Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, přednáška z farmakologie II Antimykobakteriální látky (Antituberkulóza. Antileprotika). 2008, str.1
- 21 Hartl, J. a kolektiv. Farmaceutická chemie IV, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2006, str. 119.
- 22 Rieder, H.I. Epidemiologic Basis of Tuberculosis Control. Saint – Michael Internat, Union Against Tuberculosis and Lung Dis, 1999, 162 s.
- 23 Styblo, K. Raviglione, M.C. Tuberculosis. Public Health Aspect. *Encyclopedia of Human Biology 2nd ed Academic Press, 1997, 8, 537–558.*
- 24 Rajecová, E.; Solová, I. Súčasný pohľad na otázky v liečbe tuberkulózy. *Klin Farmakol Farm, 2003, 1, 25–28.*
- 25 Hrdina, R. Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, přednáška z farmakologie II Antimykobakteriální látky (Antituberkulóza. Antileprotika), 2008, str. 2–3.
- 26 Maher, D.; Chaulet, P.; Spinaci, S.; Harries, A. Treatment of tuberculosis. *Guidelines for national programmes WHO /TB/ 97.220, 1997, 77s.*
- 27 Kopřiva, F. BCG očkování a jeho komplikace. *Pediatric pro praxi, 2003, 3, 140.*
- 28 Hrdina R., Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, přednáška z farmakologie II Antimykobakteriální látky (Antituberkulóza. Antileprotika), 2008, str.4
- 29 Bárt, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Med, 2007, 9(9), 372–373.*
- 30 Guidelines for the programmatic management of drug – resistant tuberculosis. Geneva, World Health Organisation 2006, WHO/ HTM/ 2006, 361.
- 31 Raviglione, M.C.; Smith, I.M. XDR tuberculosis – implications for global public health. *N Engl J Med, 2007, 7, 656–659.*

- 
- <sup>32</sup> Migiori, G.B.; Loddenkemper, R.; Blasi, F.; Raviglione, M.C. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus; the new XDR – TB threat. Is „science“ enough to tackle the epidemic? *Eur Respir J*, 2007, 29, 423–427.
- <sup>33</sup> Barry, P.J.; O'Connor, T.M. Novel agents in the management of Mycobacterium tuberculosis disease. *Curr Med Chem*, 2007, 14(18), 2000–8.
- <sup>34</sup> Doležal, M.; Buchta, V. Aktuální pohled na skupinu antimykotik. *Praktické lékařství*, 2006, 1, 10–14.
- <sup>35</sup> Rozsypal H. Systémová antimykotika. *Klin Farmakol Farm*, 2008, 22(1): 40–44.
- <sup>36</sup> De Clercq, E.; Field, H.J. Antiviral Chemistry & Chemotherapy's current antiviral. FactFile 2008 (2nd edition): RNA viruses. *Antivir Chem Chemother*, 2008, 19(2), 63–74.
- <sup>37</sup> Hartl, J. a kolektiv. Farmaceutická chemie IV, Praha, Nakladatelství Karolinum, 2006, str. 125.
- <sup>38</sup> Beigel, J.; Bray, M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res*, 2008, 78(1), 91–102.
- <sup>39</sup> Furuta, Y.; Takahashi, K.; Kuno-Maekawa, M.; Sangawa, H.; Uehara, S.; Kozaki, K.; Nomáda, N.; Egawa, H.; Shiraki, K. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(3), 981–6.
- <sup>40</sup> Furuta, Y.; Takahashi, K.; Fukuda, Y.; Kuno, M.; Kamiyama, T.; Kozaki, K.; Nomáda, N.; Egawa, H.; Minami, S.; Watanabe, Y.; Narita, H.; Shiraki, K. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002 Apr, 46(4), 977–81.
- <sup>41</sup> Sidwell, R.W.; Barnard, D.L.; Day, C.W.; Smees, D.F.; Bailey, K.W.; Wong, M.H.; Morrey, J.D.; Futura, Y. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(3), 845–51.
- <sup>42</sup> Morfeu, J.D.; Taro, B.S.; Siddherthan, V.; Wang, H.; Cristensen, A.J.; Furuta, Y. Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents. *Antiviral Res*, 2008.
- <sup>43</sup> Singh, S.B.; Tomassini, J.E. Synthesis of natural flutimide and analogous fully substituted pyrazine-2,6-diones, endonuclease inhibitors of influenza virus. *J Org Chem*, 2001, 66(16), 5504–16.
- <sup>44</sup> Tomassini, J.E.; Davies, M.E.; Hastings, J.C.; Lingham, R.; Mojena, M.; Raghoobar, S.L.; Singh, S.B.; Tkacz, J.S.; Goetz, M.A. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(5), 1180–1193.
- <sup>45</sup> Doležal, M. Biologicky aktivní pyraziny p írodního a syntetického p vodu. *Chem. Listy*, 2006, 100, 959–966.
- <sup>46</sup> <http://www.economy-point.org/p/pyrazin.html>, staženo 13.3.2009.
- <sup>47</sup> Riveles, K.; Roza, R.; Arey, J.; Talbot, P. Pyrazine derivatives in cigarette smoke inhibits hamster oviductal functioning. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 2004, 2, 23.
- <sup>48</sup> Foks, H.; Sawlewicz, J. N-oxides of 2-pyrazinecarboxylic acid. *Acta Pol Pharm*, 1964, 21:429–36.
- Bernardi, L.; Luini, F.; Palamidessi G. Derivatives of pyrazine. XII. Sulfonilamidodimethoxypyrazine. *Farmaco*, 1969, 24(5), 500–11.
- <sup>49</sup> Abe, Y.; Shigeta, Y.; Uchimaru, F. a kol. (Daiichi Seiyaku Co., Ltd.) Methyl 6-methoxypyrazine-2-carboxylate. Japan 69 12,898 (1969); *Chem. Abstr.* 71, 112 979y (1969).
- <sup>50</sup> Doležal, M.; Hartl, J.; Krinková, J.; Odlerová, Ž. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinecarboxylic acid derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 1998, vol. 23, no. 1, p. 51–58.
- <sup>51</sup> Pilarski, B.; Foks, H.; Osmialowski, K.; Kaliszczan, R. *Monatsh. Chem.* 1984, 115, 179.
- <sup>52</sup> Nováček, L.; Palát, K.; Čeledník, M. *Chem listy*, 1963, 57, 299.
- <sup>53</sup> Cheeseman, G.W.H. *Chem. Soc.*, 1960, 82, 242.