

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva II.

Hradec Králové, 2007

Jaroslava Pagáčová

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

V Hradci Králové 14. 5. 2007

.....
Jaroslava Pagáčová

OBSAH

Cíl diplomové práce.....	3
1. Úvodní část.....	4
1.1. Tuberkulóza.....	4
1.2. Prevence	9
1.3. Terapie.....	10
1.3.1. Antituberkulotika (chemoterapie TBC).....	12
1.3.1.1. Antituberkulotika první volby.....	12
1.3.1.2. Ostatní antituberkuloticky používané látky.....	16
1.3.1.3. Látky ve vývoji.....	20
2. Teoretická část.....	22
2.1. Vlastnosti pyrazinového jádra	22
2.2. Příprava N-oxidů pyrazinu	23
2.3. Příprava funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny	24
2.3.1. Příprava acylhalogenidů.....	24
2.3.2. Příprava anilinů karboxylových kyselin.....	25
3. Experimentální část.....	27
3.1. Přístroje a chemikálie	27
3.2. Schéma prováděných reakcí	28
3.2.1. Příprava výchozí kyseliny	28
3.2.2. Příprava vlastních anilidů.....	28
3.3. Příprava pyrazin-2-karboxylové kyseliny	29
3.4. Příprava 4-N-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny	30
3.5. Příprava 4-N-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny	31
3.6. Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny	32
3.6.1. Příprava chloridů pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	32
3.6.2. Příprava anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny	33
3.7. Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky	34
3.7.1. (4-dimethylaminofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	34
3.7.2. (4- <i>iso</i> -propylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny	35
3.7.3. (2-methylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	36
3.7.4. (3-methylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	37
3.7.5. (2-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny	38
3.7.6. (3-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny	39
3.7.7. (4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny	40
3.7.8. (4-hydroxyfenyl)amid 4-N-oxid-pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	41
3.7.9. (4- <i>iso</i> -propylfenyl)amid 4-N-oxid-pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	42
3.7.10. (3-methoxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	43
3.7.11. (3,5-dimethoxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	44
3.7.12. (4-acetylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny	45
4. Biologické hodnocení.....	46
4.1. Antituberkulotická aktivita	46
4.2. Antimykotická aktivita	46
4.3. Herbicidní aktivita	48
4.3.1. Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu	48
4.3.2. Testování redukce obsahu chlorofylu v <i>Chlorella vulgaris</i>	48
5. Diskuse.....	50
6. Závěr.....	54
7. Seznam literatury	57

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

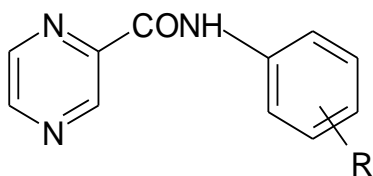
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem. Doplnkově je u nově připravených látek zjišťována jejich schopnost inhibovat fotosyntézu. Tato diplomová práce je dílčím příspěvkem k řešení výzkumných úkolů katedry.

Cílem diplomové práce je pokusit se připravit biologicky (tj. především antimykobakteriálně) aktivní deriváty pyrazinkarboxylové kyseliny, konkrétně látky typu anilidů, substituovaných pouze na aromatickém kruhu.

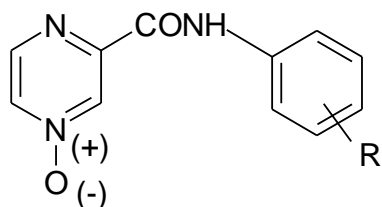
Konkrétní úkoly :

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

Obecné vzorce připravovaných látek:



R = 2-OH, 3-OH, 4-OH,
2-CH₃, 3-CH₃,
3-OCH₃, 3,5-OCH₃, 3-COCH₃,
4-*iso*-propyl, 4-N(CH₃)₂



R' = 4-OH, 4-*iso*-propyl

1. ÚVODNÍ ČÁST

1.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je celosvětově rozšířené infekční onemocnění způsobené *Mycobacterium tuberculosis* komplex, což je skupina obligátních patogenů zahrnující několik blízce příbuzných druhů, vykazující více než 95% DNA/DNA homologii *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*.

Jsou to aerobní, nesporulující, nepohyblivé, mírně zahnuté nebo rovné tyčky o velikosti 0,2–0,6 x 1–10 µm. Vysoký obsah lipidů v buněčné stěně vytváří hydrofobní bariéru, která zabraňuje pronikání běžných anilinových barviv. Generační doba je dlouhá 25–32 hodin a závisí na růstových podmínkách. Vyznačují se fakultativně intracelulárním parazitismem se schopností přežít v organismu po dlouhou dobu v dormativním stavu. *M. tuberculosis* je hlavním a nejčastějším původcem tuberkulózy.

Celosvětově je podle údajů WHO infikována tuberkulózou až 1/3 populace. Ročně je zjišťováno téměř 9 milionů nových onemocnění a asi 2 miliony úmrtí. Zhruba 95% nových onemocnění a 98 – 99 % úmrtí na TBC je v rozvojových zemích.¹

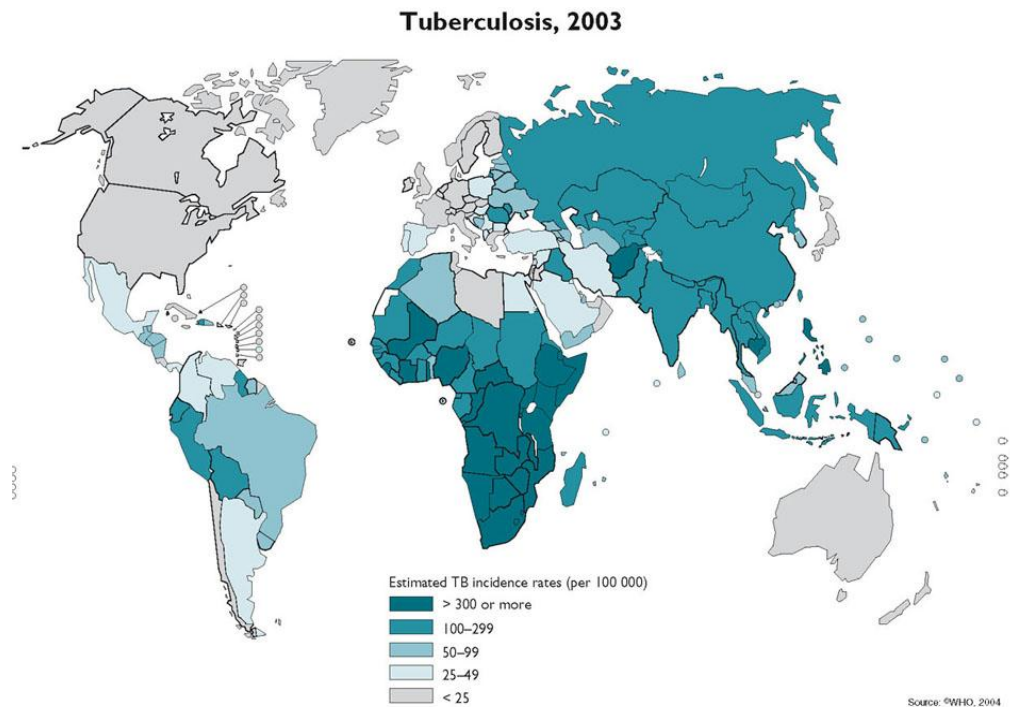
Dále až 1/3 ze 42 milionů žijících lidí s HIV/AIDS jsou současně infikováni také tuberkulózou. Přibližně 90% z nich umírá během několika měsíců po projevu klinických symptomů tohoto onemocnění.²

Podle předpokladů WHO vzroste mezi rokem 2002 a 2020 počet infikovaných na 100 milionů, 150 milionů lidí bude trpět daným onemocněním a pro 36 milionů bude mít nemoc fatální následky.³

V mezinárodním srovnání je Česká republika řazena mezi země s příznivou epidemiologickou situací a je srovnatelná se západoevropskými zeměmi. V 90. letech ČR zaznamenala zastavení trvalého poklesu incidence TBC a po několikaleté stagnaci je od roku 1999 patrný další pokles. V roce 2005 klesl historicky poprvé celkový počet

nahlášených onemocnění tuberkulózou všech forem a lokalizací pod 1 000 (967 případů) a plicní tuberkulóza tvořila z tohoto počtu 806 případů, bakteriologicky ověřená plicní tuberkulóza byla zjištěna u 559 nemocných a počet epidemiologicky nejzávažnějších případů s mikroskopickým průkazem byl celkem 293.

Obr. 1 : Země s nejčastějším výskytem tuberkulózy⁴



WHO začátkem 90. let 20. století vyhlásila globální DOTS (Directly Observed Treatment Strategy) strategii s cílem dostat situaci TBC pod kontrolu. Tvoří ji pět hlavních součástí, ze kterých vycházejí národní programy zapojivších se zemí:

1. dlouhodobý politický závazek vlád při udržování národního programu
2. běžná dostupnost mikroskopického vyšetření sputa
3. používání standardních, krátkodobých, přímo kontrolovaných chemoterapeutických režimů u všech nemocných s TBC
4. systém nepřerušovaného dodávání kvalitních léků
5. systém evidence a notifikace všech nemocných TBC, umožňující hodnocení účinnosti a výsledků programu.¹

Patogeneze

TBC infekce se přenáší vzduchem ve formě drobných kapének o průměru od 1 do 5 μm . Tyto kapénky vylučuje nemocný s plicní nebo laryngeální tuberkulózou při kašli, kýchání, mluvení nebo zpěvu. Kapénky mohou být rovněž vytvářeny při inhalační léčbě, při bronchoskopii, při indukci sputa a při manipulaci s tkáněmi nebo sekrety v laboratoři. Tyto drobné kapénky obsahující 2–3 mikroorganismy *Mycobacterium tuberculosis* jsou dostatečně malé, aby se udržely delší dobu ve vzduchu. Po inhalaci se drobné kapénky implantují v respiračních bronchiolech nebo alveolech a následně jsou pohlceny alveolárními makrofágy. Zda dojde k infekci, záleží na mikrobicidní schopnosti alveolárních makrofágů a virulenci bakterií. Pokud přežijí, proliferují uvnitř makrofágů, cestou lymfatických cév se dostávají do regionálních lymfatických uzlin a během 2–12 týdnů dosáhne celkový počet mykobakterií 1 000 až 10 000 a dojde k buňkami zprostředkované imunitní odpovědi, kterou lze prokázat pozitivitou tuberkulinového testu. U imunokompetentních osob dochází k akumulaci aktivovaných T lymfocytů a makrofágů s tvorbou granulomů, které opouzdří mykobakteria a zamezí jejich šíření a jejich proliferaci. V centru granulomů mohou živá mykobakterií zůstat po řadu let a za vhodných podmínek později vyvolat klinicky manifestní onemocnění.¹

Následky tuberkulózní infekce pro organismus závisí na množství a virulenci mykobakterií, na opakování styku s infekčním zdrojem a na stavu imunitního systému infikovaného jedince. Při styku s infekcí může organismus reagovat trojím způsobem:

- 1) organismus není infikován
- 2) organismus je infikován, ale nedochází k manifestnímu onemocnění
- 3) vzniká manifestní onemocnění. Důvodem může být velké množství a vysoká virulence bakterií i nedostatečný stupeň imunity.

Manifestní onemocnění se dělí na primární a postprimární:

Primární tuberkulóza vzniká při prvním styku organismu s tuberkulózní infekcí. Základním znakem je postižení regionálních dutin, které odpovídají místu proniknutí infekce do organismu. Je nejčastější v dětském věku, protože většinou děti se setkávají s infekcí poprvé. U dětí je vývoj onemocnění celkem příznivý bez přechodu k rozpadům a s tendencí ke spontánnímu hojení. Onemocnění se může projevovat zvýšenou teplotou, nechutenstvím, snížením celkové aktivity. V případě dospělých se

jedná o tzv. pozdní primoinfekci. Uzlinová složka nebývá tak výrazná a onemocnění má od počátku tendenci k progresi, rozpadům, bronchogenním rozptylům.

Postprimární tuberkulóza vzniká u osob, které prodělaly tuberkulózu primární. Může vznikat přímým přechodem z primární formy nebo endogenní reaktivací starého kalcifikovaného primárního ložiska, obsahujícího mykobakterií při oslabení imunity. Další možností je nová exogenní superinfekce. Podle časového odstupu mezi primární a postprimární TBC se rozlišuje časná a pozdní postprimární forma. Časné postprimární formy vznikají do 1 roku po infekci. Patří mezi ně tuberkulózní meningitida, akutní miliární tuberkulóza, meningoencefalitida a akutní exsudativní pleuritida. Pozdní postprimární formy postihují kosti a klouby - 1 až 2 roky po primoinfekci, močové cesty a genitální systém za 3 roky po primoinfekci a ledviny za 10 let i více po primoinfekci. Infekce může začít bez výraznějších příznaků nebo plíživě necharakteristickými příznaky, které většina pacientů líčí jako chřipkové onemocnění. Při těžkém průběhu je přítomna teplota, noční poty, kašel s expektorací, vytvoření pleurálního výpotku, nodózní erytém.

Podle lokalizace se TBC rozděluje do dvou základních skupin:

- TBC dýchacího ústrojí (80 % případů)
- TBC mimoplicní (20 % případů), postiženy mohou být mízní uzliny, kosti a klouby, urogenitální trakt, kůže, pleny mozkové, perikard, peritoneum, GIT.⁵

Klinický obraz¹

Tuberkulóza může probíhat symptomaticky, především v časném stadiu při nevelkém postižení. Charakteristický je nenápadný nástup a pozvolné zhoršování příznaků specificky respiračních v kombinaci s celkovými orgánově nespecifickými projevy. Příznaky se vyvíjejí během týdnů až měsíců a často jsou nemocnými dlouho podceňovány.

- **Kašel** je nejčastějším příznakem a je přítomen téměř u všech nemocných s bakteriologicky ověřenou tbc. Je trvalý, dráždivý, zpočátku suchý až později při vytvoření tuberkulózních kaveren může být množství vykašlávaného sputa velké.
- **Hemoptýza** je masivní a život ohrožující jen zřídka.

- **Dušnost** se vyskytuje u rozsáhlého postižení, pravděpodobně více než 20% plicního parenchymu. U nemocných s preexistujícím plicním onemocněním se objevuje i u méně pokročilých forem.
- **Postupné hubnutí** je dalším typickým projevem TBC. Zpravidla není úbytek na váze dramatický, ale u dlouho neléčených nemocných může dojít až k 50% úbytku tělesné hmotnosti během několika měsíců.
- **Elevace tělesné teploty** má typický charakter subfebrilní s maximem ve večerních hodinách. Febrilie přes 39°C se vyskytují v menší frekvenci.
- **Noční poty** jsou často profuzní. Zvýšené pocení se může objevit i během dne, zvláště při spánku.
- **Bolest na hrudi** není typický příznak nemoci. Pokud se vyskytuje, nebývá silná a nemocný ji obtížně lokalizuje. Ojedinele může mít i pleurální charakter při lokalizaci změn v blízkosti poplicnice.
- **Celkové příznaky**, malátnost, zvýšená únavnost a celková slabost, mají progredující intenzitu a v některých případech jsou nemocní vyčerpaní i po krátké chůzi po rovině.

Diagnostika

Diagnostika plicní TBC je založena na klinickém obrazu, zobrazovacích metodách a mikrobiologickém průkazu tuberkulózních bacilů. K definitivní diagnóze TBC patří průkaz mykobakterií tuberkulózy v biologickém materiálu, nejčastěji je vyšetřováno sputum. Nejrychlejší a poměrně levnou metodou je mikroskopické vyšetření. Provádí se obarvení preparátů Ziehl-Neelsonovou metodou ve světelném mikroskopu nebo po obarvení fluorochromem ve fluorescenčním mikroskopu.

Kultivační vyšetření je citlivější metoda, bývá pozitivní pokud je přítomno 1 000 bacilů v 1 ml vzorku. Nevýhodou je dlouhá doba kultivace, standardně nejdříve za 6 týdnů a předběžně je možno odečítat nejdříve po 3 týdnech.¹

Pomalý růst v primokultuře i subkultuře je u obligátně patogenních mykobakterií podmíněn neobyčejně dlouhou generační dobou, která je u *Mycobacterium tuberculosis* 20 až 30 hodin. Při průkazu je tedy třeba očekávat růst ve viditelných makrokoloniích nejdříve po 12 až 14 dnech a u materiálů paucibacilárních (obsahujících nízký počet kultivovatelných jedinců) až po 6 i více týdnech od inokulace.⁶

1.2. Prevence

V ČR se provádí primovakcinace proti TBC u novorozenců s porodní váhou více než 2 500 g od 4. dne a nejpozději do konce 6. týdne po narození a revakcinace v 11 letech věku. K očkování se používá živá, oslabená vakcína, připravená z kmene *M. bovis*. Očkování snižuje riziko závažných forem TBC, miliární TBC a TBC meningitidy.¹

BCG vakcína je živá lyofilizovaná vakcína k imunizaci proti TBC, zajišťuje významnou ochranu proti ne-tuberkulózním mykobakteriím. Používá se k aktivní imunizaci proti tuberkulóze u novorozenců, tuberkulin negativních dětí, dospívajících a dospělých. BCG vakcinace se provede nejdříve 4. den a nejpozději v 6. týdnu života, novorozenci a kojenci mladší než 6 týdnů mohou být očkovaní bez předchozí tuberkulinové zkoušky. Jedinci od 6 týdnů věku výše by neměli být očkovaní bez předchozí tuberkulinové zkoušky metodou Mantoux. Při negativním výsledku tuberkulinové zkoušky ve 2. a 11. roce věku se děti přeočkují proti TBC. Ve druhém roce věku dítěte se však tuberkulinová zkouška provede jen u dětí, které nemají prokazatelnou jizvu po očkování provedeném v novorozeneckém období. Vakcína se aplikuje přísně intradermálně, pomalu, nad distální úpon deltového svalu. Nesprávně aplikovaná injekce příliš hluboko (podkožně) nebo vyšší dávka vakcíny zvyšují riziko vzniku abscesů nebo hnisavé lymfadenitidy.

Očkování nevyvolává kompletní ochranu před onemocněním, ale zvyšuje odolnost vůči tuberkulózní infekci a zabrání těžkým formám TBC.⁷

V současnosti jsou vyvíjeny nové očkovací látky:

- oslabené kmeny *M. tuberculosis*, které vznikají manipulací s chromozomy mykobakterie
- vakcíny tvořené proteinovými podjednotkami mykobakterií
- vakcíny tvořené nukleovou kyselinou³

Ke kontrolním opatřením, která mohou signifikantně snížit TBC morbiditu, patří i preventivní chemoterapie, která se provádí u osob se zvýšeným rizikem TBC. *Primární chemoprophylaxe* (chemoprevence) se provádí u osob dosud neinfikovaných, ale exponovaných nákaze. *Sekundární chemoprophylaxe* se provádí u osob již infikovaných k zabránění přechodu latentní infekce v manifestní onemocnění. Chemoprophylaxe se v ČR provádí monoterapií isoniazidem zpravidla po dobu 6 měsíců¹

1.3. Terapie

To, že byl člověk v minulosti proti TBC očkovan, neznamená, že nemůže později tuberkulózou onemocnět.

V terapii používaná antituberkulotika nejsou proti této nemoci dostatečně efektivní, protože vznikají nové rezistentní kmeny mykobakterií. Proto je kladen důraz na vývoj nových způsobů terapie:

- **studie genomu mykobakterií**, jehož poznání umožní vysvětlit specifické mykobakteriální funkce a vytvořit tak nový pohled na cílové místo účinku léčiv
- **imunoterapie** - představuje důležitý doplněk moderní chemoterapie k překonání problémů s non-compliance a rezistencí na řadu léčiv. Stimulací TH1-buněk dojde k zvýšené tvorbě cytokinů (interferon- γ , interleukin-2), které jsou důležité pro antimykobakteriální aktivitu mnoha léčiv. V současnosti jsou studie zaměřeny na *Mycobacterium vaccae*, které je považováno za silný TH1 adjuvant.
- **chemoterapie** - byla zahájena již ve 40. letech 20. století. V této době byla objevena celá řada v současnosti používaných léčiv. V terapii se používají kombinace více léčiv, přičemž isoniazid a rifampicin jsou základní složkou moderní chemoterapie.

Současné zdokonalení biologických technik pomohlo odhalit mechanismy účinku těchto látek. Mezi cílová místa působení antituberkulotik se řadí zásah do:

- proteosyntézy (streptomycin)
- syntézy nukleové kyseliny (inhibicí biosyntézy tetrahydrolistové kyseliny- kyselina paraaminosalicylová)
- DNA topoisomerasy (chinolony)
- syntézy buněčné stěny (etambutol)
- mykolové kyseliny a další lipidy (isoniazid)
- isocitrátlyasy (chybí u živočišných buněk), toto cílové místo je využíváno pro léčbu latentních forem choroby (nitropropionová kyselina).²

Cíle léčby lze shrnout do následujících bodů :

- * vyléčit nemocného s tuberkulózou
- * zabránit úmrtí na aktivní tuberkulózu a předejít pozdním následkům
- * zabránit relapsu onemocnění
- * minimalizovat možnost přenosu TBC na ostatní
- * zabránit vzniku lékové rezistence

Léčba musí být dlouhodobá, nejméně 6 měsíců, nepřerušovaná, léky musí být podávány v kombinacích (jediná indikace monoterapie je profylaktická léčba) a v adekvátních dávkách.

Léčebný režim je rozdělen do dvou fází :

- * **iniciální fáze**, která trvá zpravidla 2 měsíce za hospitalizace na odděleních TRN (tím je také zajištěna přímá kontrola léčby a též i izolace nemocných)
- * **pokračovací fáze**, která je obvykle ambulantní a trvá 4 – 6 měsíců¹

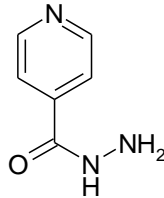
Tabulka č. 1 : Farmakoterapie tuberkulózy⁸

	Počáteční fáze	Stabilizační fáze
Standardní krátkodobá terapie (6 – 7 měsíců)	izoniazid + rifampicin + pyrazinamid event. streptomycin nebo etambutol po dobu 2 (event. 3 měsíců)	izoniazid + rifampicin po dobu 4 měsíců
9-12 měsíční terapie	izoniazid + rifampicin + etambutol nebo streptomycin nebo protionamid po dobu 2 (event. 3) měsíců	izoniazid + rifampicin po dobu 7 (až 10) měsíců

1.3.1. Antituberkulotika (chemoterapie TBC)

1.3.1.1. Antituberkulotika první volby^{2, 8, 9, 10}

Isoniazid (INH)



Typ léčiva : hydrazid kyseliny isonikotinové

MÚ: - působí baktericidně na rostoucí tbc bacily

- oxiduje se na kyselinu izonikotinovou za účasti enzymů katalasy a peroxidasy obsažených v cytoplasmě, která pro svůj negativní náboj velmi obtížně opouští buňku, proto se v ní kumuluje

Rezistence : mutace katalázy je příčinou až 1/3 reistentních kmenů *M. tuberculosis*

Způsob podání : p.o. ráno na lačno, aby se dosáhlo vysoké a rovnoměrné biologické dostupnosti (kompetice s potravou i antacidy)

Dávka : 5mg/kg/den

maximum pro dospělé 300mg/den

NÚ : závratě, bolesti hlavy, hyperreflexie, svalové záškuby, parestezie, encefalopatie, deficit pyridoxinu (15 - 50 mg denně předchází vzniku nervových poruch), zvýšené sérové hladiny jaterních transaminas, hepatotoxicita (dána metabolitem N-acetylhydrazin), poruchy trávicího ústrojí a močového měchýře navíc u pomalých acetylátorů s renální nedostatečností je zpomalen o odbourávání hepatotoxických metabolitů a dochází k jejich kumulaci v ledvinách

KI : akutní jaterní onemocnění, periferní neuropatie, psychózy, epilepsie

LI : látky stimulující CNS → zvyšuje pohotovost ke křečím

fenytoin inhibuje jeho metabolismus a naopak

p-aminosalicylová kyselina sniží rychlost jeho eliminace

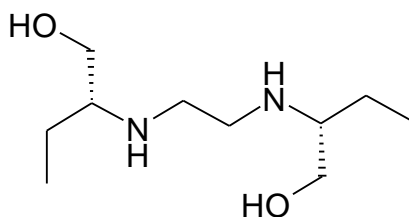
deriváty kumarinu → prodloužení krvácivosti

Použití : aktivní, klinicky se projevující onemocnění společně s etambutolem,

rifampicinem nebo streptomycinem

profylaxe i léčba tuberkulózní meningitidy

Ethambutol



Typ léčiva : derivát ethylendiaminu

MÚ : - bakteriostatický účinek

- zasahuje do syntézy buněčné stěny
- aktivita léčiva je stereospecifická, pravotočivý stereoizomer je nejaktivnější (*S,S*-izomer je 600krát účinnější než *R,R*)

Způsob podání : p.o. ráno na lačno

Dávka : 25 mg/kg/den, po 2 měsících 20 mg/kg

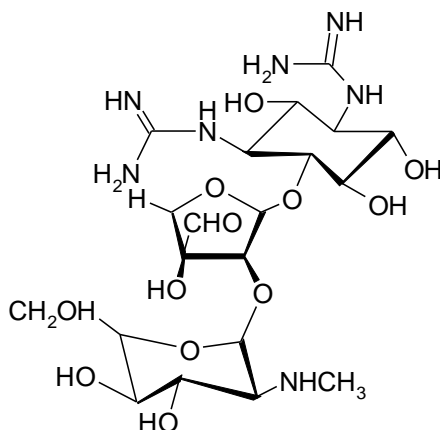
maximální denní dávka 2,0 g

NÚ : vzácné : leukopenie, alergické reakce, periferní neuritida, poškození ledvin, snížené vylučování kyseliny močové s následnými záchvaty dny, snížení zrakové ostrosti, omezení zorného pole, ztráta vidění zelené barvy

KI : poškození ledvin

Použití : pouze kombinovaná terapie, zvláště při rezistenci terapie vůči jiným léčivům

Streptomycin



Typ léčiva : aminoglykosidové antibiotikum izolované ze *Streptomyces griseus*

MÚ : - inhibice syntézy proteinů vazbou na ribosomální podjednotku 30S

- působí baktericidně

Rezistence : vzniká velmi rychle

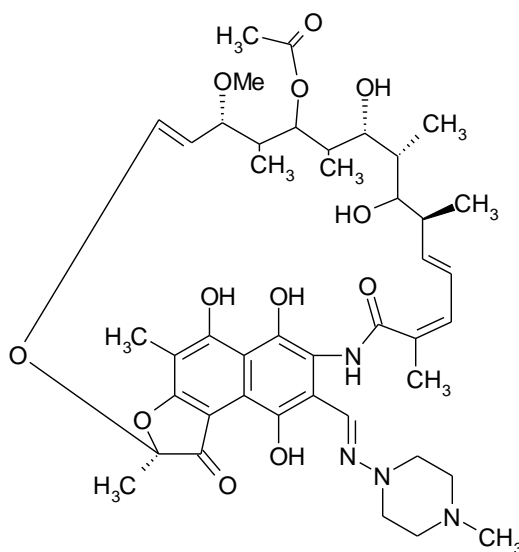
Způsob podání: i.m., intrathekálně

Dávka : 15 – 20 mg/kg/den

NÚ : poškození 8. hlavového nervu projevující se postižením vestibulárního aparátu a později také poškozením *n. acusticus*, lokální dráždivost, alergické reakce (exantémy, anafylaktické reakce) v místě podání i u ošetřujícího personálu

Použití : tuberkulózní meningitida v dětském věku – život zachraňující léčivo
v iniciační fázi terapie tuberkulózy se používá maximálně 2 až 3 měsíce

Rifampicin



Typ léčiva : semisyntetické ansamycinové antibiotikum

MÚ : - inhibice DNA - dependentní RNA - polymerasy

- úzké antimikrobní spektrum s bakteriostatickým účinkem, ve vyšších dávkách působí baktericidně

Rezistence : velice vzácná, neexistuje zkřížená rezistence s ostatními antituberkulotiky

Způsob podání : p.o. ráno na lačno

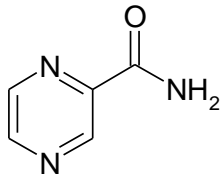
Dávka : 10 mg/kg/den, max. 600 mg/den

NÚ : lehké poruchy jaterních funkcí, zažívací obtíže, kožní reakce, poruchy CNS
při intermitentním podání nebezpečí imunopatologických reakcí s horečkami, krevními dyskrasiemi a šokovými stavy; proto se musí podávat denně
oranžové zbarvení moči, stolice, potu, sputa, slz, séra

LI : je silným induktorem jaterních mikrosomálních enzymů

Použití : také u atypických mykobakterií ve stejném terapeutickém režimu

Pyrazinamid (PZA)



Typ léčiva : látka příbuzná nikotinamidu, chemoterapeutikum používané od roku 1985

MÚ : - bakteriostatický nebo baktericidní účinek v závislosti na koncentraci v místě infekce

- na rozdíl od ostatních antituberkulotik je méně znám
- PZA je pro léčivo, které je bakteriální nikotinamidasou/pyrazinamidasou přeměněno na aktivní pyrazinkarboxylovou kyselinu (*M. tuberculosis* se vyznačuje vysokou vnímavostí - postrádá eflux pyrazinkarboxylové kyseliny); přítomností pyrazinkarboxylové kyseliny je v kyselém prostředí významně redukován uptake uracilu a methioninu, tedy dochází ke snížení syntézy RNA a proteinů a tím také k narušení membránového potenciálu, který je nezbytný pro membránový transport¹¹
- kyselé pH je nezbytné pro jeho aktivitu - usnadňuje vytváření protonizované pyrazinkarboxylové kyseliny a její průnik přes membránu

Rezistence : vzniká snadno, avšak zkřížená rezistence s isoniazidem či jinými antituberkulotiky se nevyskytuje

Způsob podání : p.o. - dobře se absorbuje z GITu

Dávka : 25 – 35 mg/kg

NÚ : hepatotoxicita (1 – 5 % nemocných) v závislosti na dávce, nauzea, zvracení, léková horečka, hyperurikémie, porfyrie, myalgie, artralgie

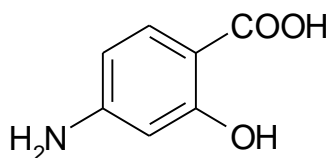
Použití : v počátečních fázích léčení – zkracuje potřebnou dobu léčení a snižuje četnost recidiv

léčba infekcí, u nichž selhala iniciální léčba jinými antituberkulotiky

1.3.1.2. Ostatní antituberkuloticky používané látky

U těchto léčiv je poměr mezi prospěchem a rizikem méně výhodný, proto se používají pouze v případech, kdy standardní léčiva jsou neúčinná nebo kdy je pacient nesnáší.

Paraaminosalicylová kyselina



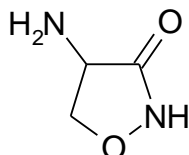
Typ léčiva : strukturální podobnost s kyselinou *p*-aminobenzoovou a se sulfonamidy

Způsob podání : p.o.

Dávka : 8-12g/den u dospělých, 300mg/kg/den u dětí

NÚ : anorexie, nauzea, průjem, bolest nebo pálení v epigastriu, peptické vředy, hemoragie, vzácně poruchy ledvin a jater, poškození štítné žlázy
po 3 – 8 týdnech používání se objevuje léková horečka, bolesti kloubů, vyrážky, granulocytopenie, neurologické příznaky

Cykloserin



Typ léčiva : širokospektré antibiotikum, derivát isoxazolidonu

MÚ : inhibice syntézy buněčné stěny citlivých G⁺ i G⁻ bakterií a *M. tuberculosis*

Způsob podání : p.o.

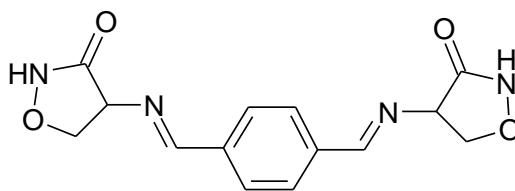
Dávka : 0,5 – 1 g denně rozděleně ve 2 denních dávkách

počáteční dávka je 250 mg každých 12 hodin po dobu dvou týdnů

denní dávka by neměla překročit 1 g

NÚ : neurotoxicita : bolest hlavy, parézy, křeče až epileptického charakteru, zmatenost, desorientace až ztráta paměti, psychózy s možností sebevražedných sklonnů
riziko náhlého selhání srdce při dávkách 1 – 1,5 g denně

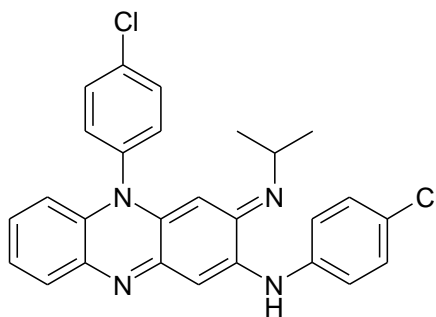
Terizidon



Typ léčiva : obsahuje v molekule dva cykloserinové podíly, proto lze tuto látku hodnotit jako cykloserin

NÚ : především v CNS

Klofazimin



Typ látky : fenazinové barvivo

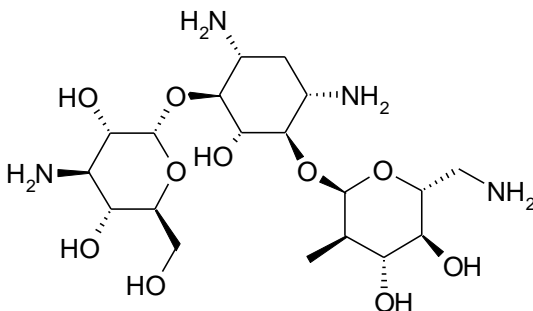
MÚ : není znám, pravděpodobně narušení membrány mykobakterií
kumuluje se v retikuloendoteliárních tkáních

Způsob podání : p. o.

NÚ : ukládá se v kůži, zbarvuje ji červeně, načervenalé jsou i tělesné sekrety

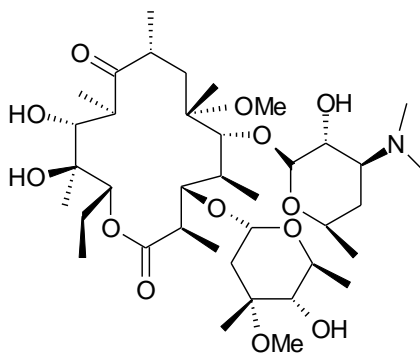
Použití : léčba lepry způsobené *Mycobacterium leprae*, kombináční terapie při léčení infekcí vyvolaných *M. avium* – intracellulare u pacientů s AIDS

Kanamycin



Typ léčiva : aminoglykosidové antibiotikum

Klaritromycin



Typ léčiva : polysyntetické makrolidové antibiotikum

derivát erythromycinu (6-O-methylethererytromycin)

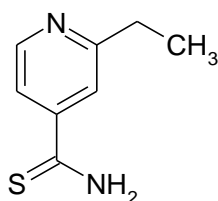
MÚ : inhibice syntézy bílkovin vazbou na 50S podjednotku ribozomů

působí bakteriostaticky

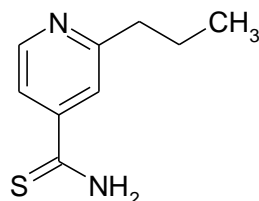
Způsob podání : p.o.

NÚ : špatná gastrointestinální snášenlivost

Ethionamid



Prothionamid



Typ léčiva : analog a INH

Rezistence : vzniká rychle a snadno *in vitro*, *in vivo*

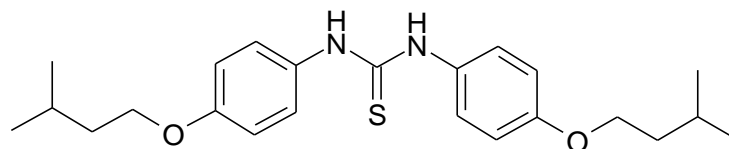
Způsob podání : p.o.

Dávka : 1 g/den

NÚ : dráždí žaludek, neurologické poruchy

Použití : dříve klinická léčba tuberkulózy

Isoxyl



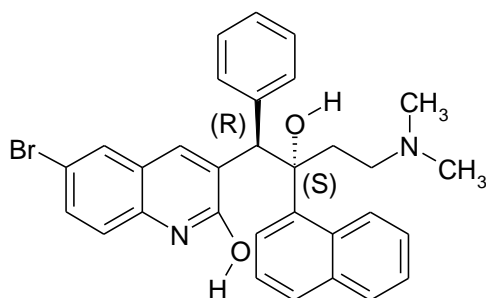
Typ léčiva : diacylderivát thiomocoviny

MÚ : inhibice syntézy kyseliny mykolové

1.3.1.3. Látky ve vývoji

Diarylchinolony

- látka R207910
- MIC 0,030 µg/ml
- MÚ : F1F0 ATP syntasa *M. tuberculosis*
- působí též na MDR-TB
- v kombinaci s pyrazinamidem vykazuje větší účinnost na infikované plíce a slezinu

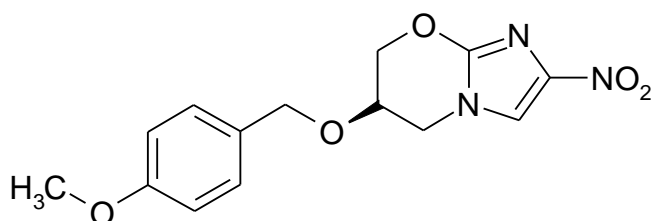


Fluorované chinolony

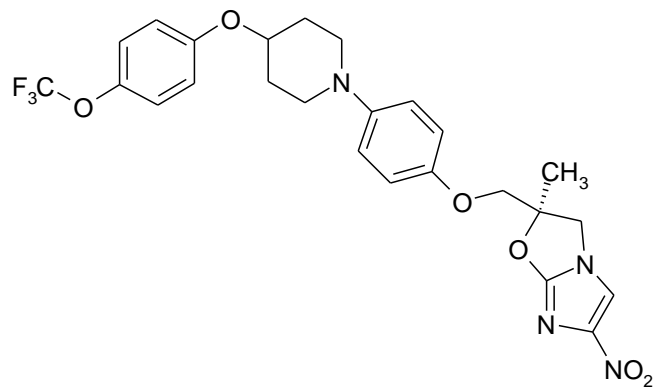
- C-8-methoxy deriváty: norfloxacin a gatifloxacin mají delší poločas a vyšší účinnost proti *M. tuberculosis* než ofloxacin a ciprofloxacin
- v kombinaci s RIF a PZA vykazují větší baktericidní účinek než kombinace INH+RIF+PZA a zkrátí dobu léčby na 4 měsíce bez relapsů

Nitroimidazoly

- nitroimidazopyran PA-824
- MIC 0,015 – 0,250 µg/ml
- vysoce účinný i proti MDR-TB
- MÚ : inhibice bakteriální mykolové kyseliny a syntézy proteinů¹²

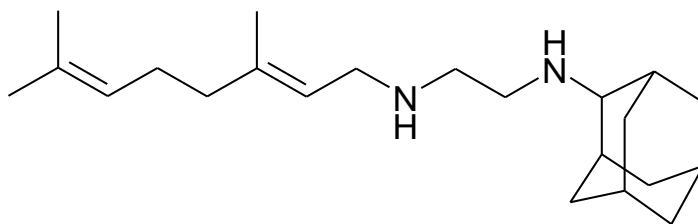


- látka OPC-67683 je klinicky zkoušena již od roku 2004



SQ109

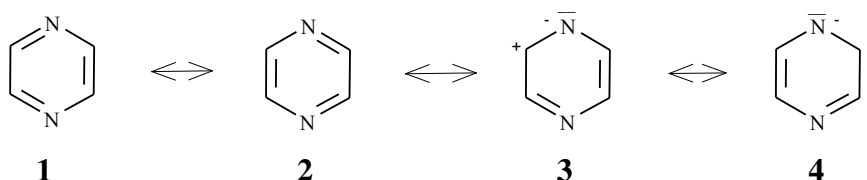
- látka odvozená od struktury ethambutolu
- vykazuje vysokou antimykobakteriální účinnost, účinná proti MDR-TB
- klinické zkoušky probíhají od roku 2006



2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vlastnosti pyrazinového jádra

Pyrazin představuje vysoce symetrickou molekulu. Pyrazinový kruh lze znázornit jako rezonanční hybrid jeho struktur (1 – 4) :



Jedná se o slabě aromatickou sloučeninu, která se svými vlastnostmi blíží vlastnostem terciárních alifatických aminů.

Tabulka č. 2 : Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly :

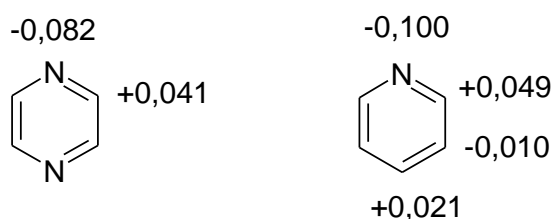
Sloučenina	% aromaticity
Benzen	100
Pyridin	82
Pyridazin	65
Pyrimidin	67
Pyrazin	75

Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base, která je v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem však bází nejslabší.¹³

Tabulka č. 3 : Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů :¹⁴

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

Z hodnot hustoty π -elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota π -elektronů je zvýšená na dusíkových atomech, zatímco na uhlíkových atomech je podstatně menší. Vypočtené hodnoty se od naměřených téměř neliší. Je patrné, že hustoty π elektronů na α uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi podobné a lze očekávat i podobnou chemickou reaktivitu α – substituovaných pyrazinů a pyridinů.

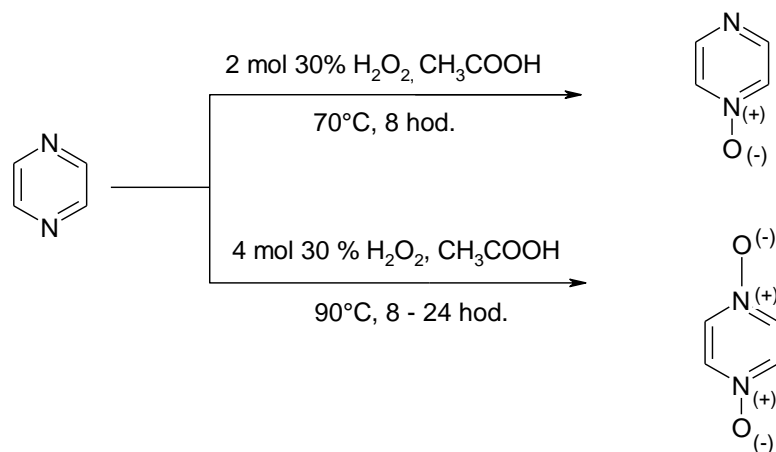


Meziatomové vzdálenosti u pyrazinu a ostatních diazinů jsou sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivní geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární, vzdálenost C - N je 13,48 nm, C - C potom 13,38 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového jádra, takže úhel sevřený N¹, α - a β - uhlíkem je o 5° ostřejší než u nesubstituovaného pyrazinu.

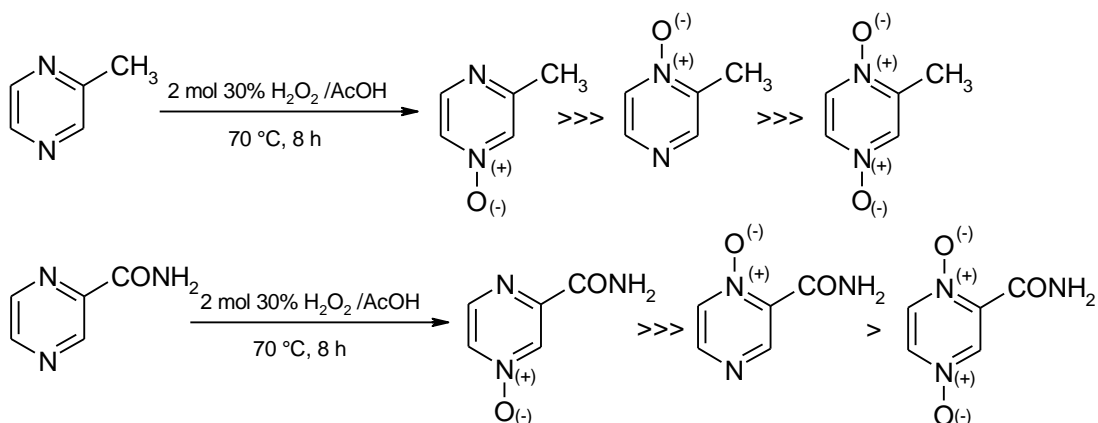
Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel – Craftsovým aromatickým substitucím. Přímý elektrofilní atak je ztížen záporným indukčním efektem dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou tedy substituce nukleofilní, obzvlášť v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na N – oxid.¹⁵ Z preparativního hlediska je významná nukleofilní substituce protonovaných heteroaromatických bazí různými typy radikálů.¹³

2.2. Příprava N- oxidů pyrazinu

N-oxidy pyrazinu se připravují pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci peroxidu vodíku přechází pyrazin na 1-mono- nebo 1,4-dioxid.¹⁶



Při peroxidační reakci se 2 moly peroxidu vodíku i při dodržení reakčních podmínek však vždy dostáváme směs produktů. Pokud je pyrazinové jádro substituováno, vzniká „1-oxid i 4-oxid“ a v malé míře i 1,4-dioxid pyrazinu.¹⁴



2.3. Příprava funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny

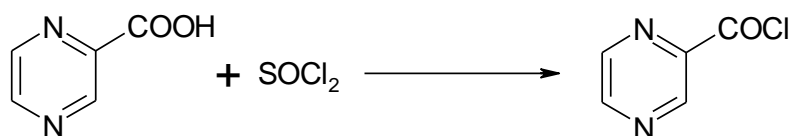
Zavedení pyrazinamidu do terapie tuberkulózy podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazinkarboxylových kyselin, která tak představuje v chemii derivátů pyrazinu poměrně nejlépe prostudovanou skupinu.

2.3.1. Příprava acylhalogenidů

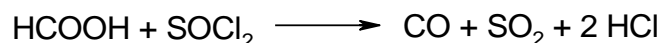
Acylhalogenidy jsou pro svou velkou reaktivitu velmi důležitými funkčními deriváty kyselin. Ze všech acylhalogenidů mají největší význam acylchloridy. K jejich

přípravě se používá reakce karboxylových kyselin s halogenidy fosforu a síry: chloridem fosforečným (PCl_5), fosforitým (PCl_3) a chloridem thionylu (SOCl_2). Někdy je vhodným činidlem pro převádění kyselin na acylchloridy fosgen, popř. chlorid kyseliny šťavelové a pro práci s citlivými kyselinami benzoylchlorid.¹⁷

Z hlediska čistoty připravovaného acylhalogenidů je nejvýhodnější použití thionylchloridu, protože veškeré zplodiny této reakce jsou plynné a dají se poměrně snadno z reakční směsi odstranit.¹⁸



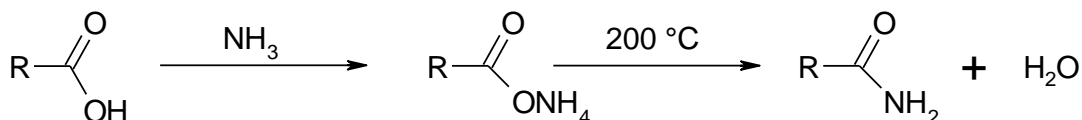
V případě, že není možné přebytek thionylchloridu oddestilovat pro blízké teploty varu thionylchloridu a vzniklého acylchloridu, odstraní se přebytečný thionylchlorid přidávkem kyseliny mravenčí podle následující rovnice:



2.3.2. Příprava anilidů karboxylových kyselin

Substituované amidy pyrazinkarboxylových kyselin lze připravit:

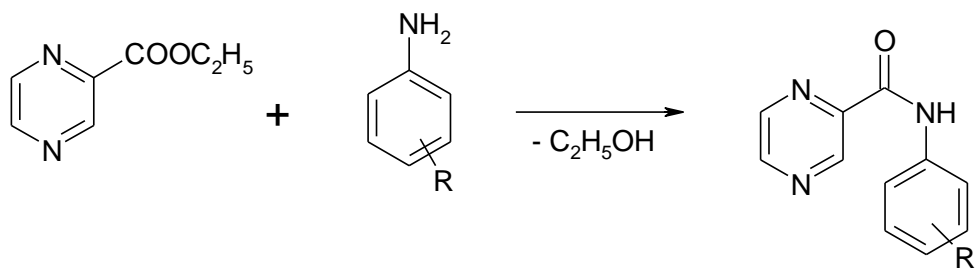
A) reakcí kyseliny - kyselina se převede na sůl s amoniakem, resp. s primárním či sekundárním aminem, následuje tepelný rozklad (za teploty kolem 200 °C). Tímto způsobem lze získat primární, ale i sekundární a terciární amidy.¹⁷



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

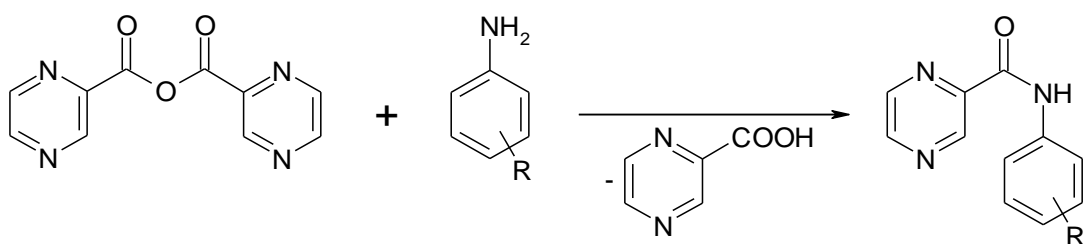
1. Aminolýza esterů pyrazinkarboxylových kyselin

Provádí se za zvýšené teploty zahříváním směsi esteru a aminu k varu. Často je rovnováha ve prospěch amidu posouvána oddestilováním volného alkoholu.



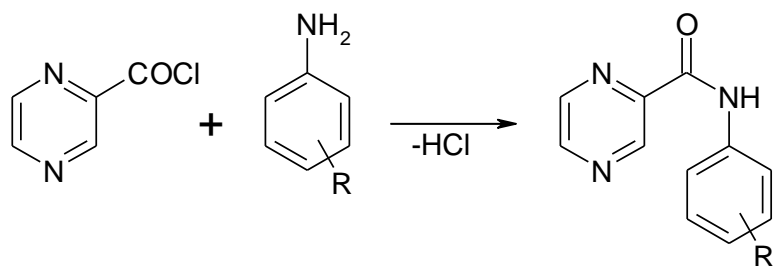
2. Aminolýza anhydridů kyselin

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



3. Aminolýza chloridů kyselin

Nejpoužívanější metodou je reakce chloridu kyseliny s primárními či sekundárními aminy. Reakce probíhá za příznivých podmínek. K vázání uvolněné kyseliny chlorovodíkové se do reakce přidává pyridin (akceptor protonů) nebo jiný terciární amin, jinak uvolněný chlorovodík vyváže 1 mol aminu.¹⁶



3. Experimentální část

3.1. Přístroje a chemikálie

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

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách SILUFOL UV 254 (Kavalier, Votice, ČR) za použití vyvíjecí soustavy toluen - aceton (1:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací ze směsi voda-ethanol za použití aktivního uhlí.

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

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

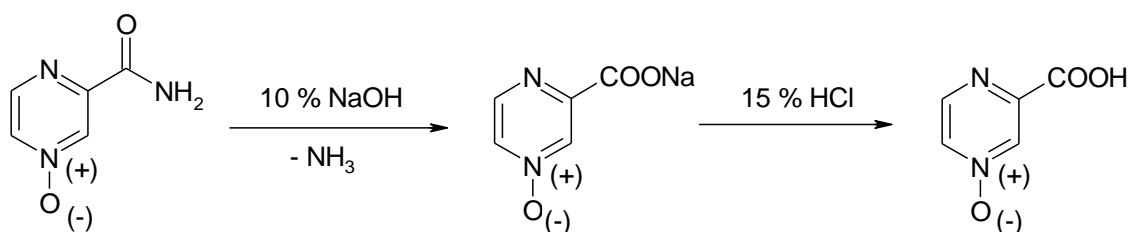
Infračervená spektra byla změřena na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 200 mg KBr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1} . Měření provedla p. Venkovská na KAOCH.

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

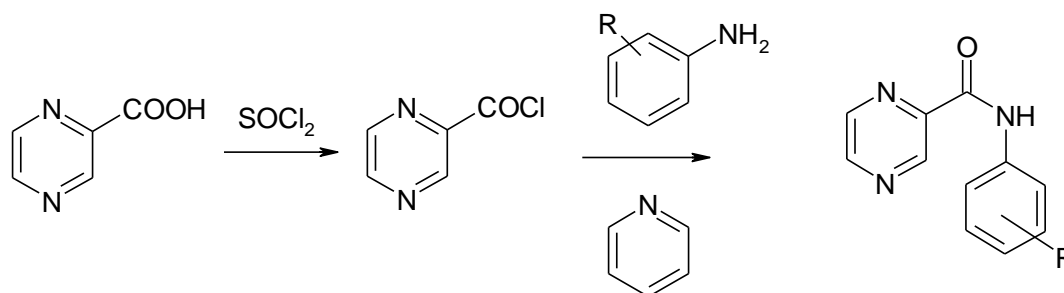
Log P sloučenin byl vypočten pomocí programů ACD/log P verze 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto) a CS ChemOffice Ultra verze 9.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.).

3.2. Schémata prováděných reakcí

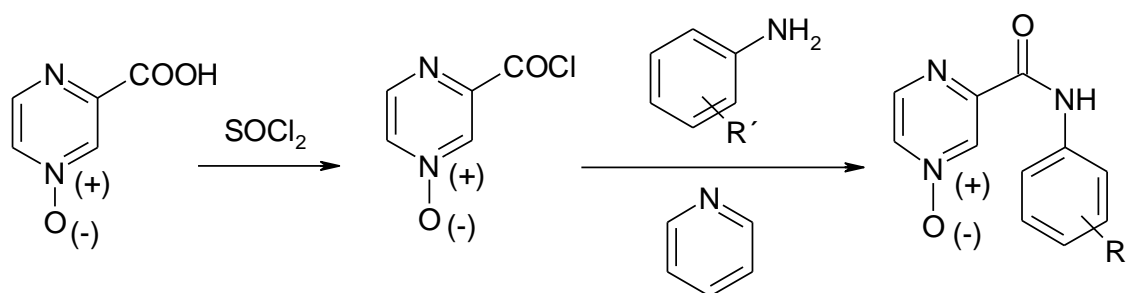
3.2.1 Příprava výchozí kyseliny



3.2.2. Příprava vlastních anilidů

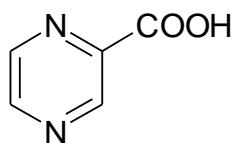


R = 2-OH, 3-OH, 4-OH
2-CH₃, 3-CH₃
3-OCH₃, 3,5-OCH₃, 3-COCH₃
4-*iso*-propyl, 4-N(CH₃)₂



R' = 4-*iso*-propyl
4-OH

3.3. Příprava pyrazin-2-karboxylové kyseliny

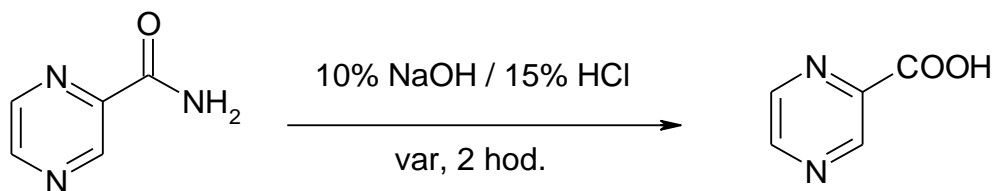


30 g (0,24 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny se smíchá se 112 ml 10% roztoku hydroxidu sodného a povaří se asi dvě hodiny. Roztok se okyselí 15% kyselinou chlorovodíkovou. Vyloučené krystaly pyrazinkarboxylové kyseliny se odsají a překrystalizují z vody.

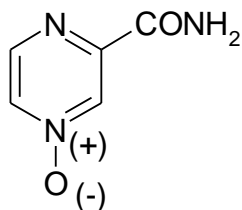
Molekulová hmotnost : 124,1

Teplota tání : 223 – 225 °C

Od roku 2006 byla používána komerčně dostupná pyrazin-2-karboxylová kyselina od firmy Aldrich.



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



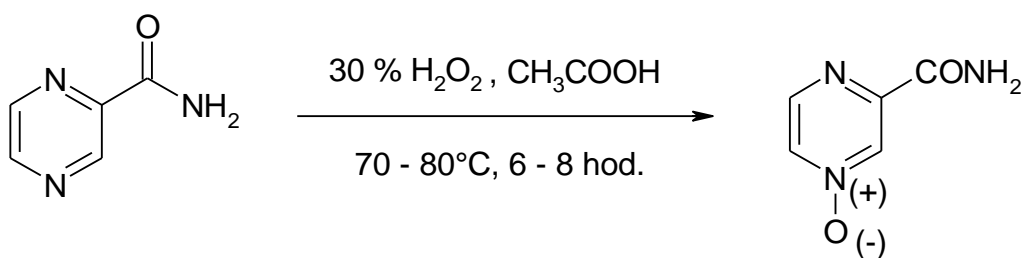
K roztoku 34,0 ml (1,1 mol) 30% peroxidu vodíku v 52,0 ml (0,9 mol) ledové kyseliny octové bylo po částech přidáno 12,8 g (0,104 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Směs byla zahřata na 70°C a dále byla teplota udržována na 70 – 80°C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byla směs ponechána přes noc v lednici. Vyloučené krystaly byly odfiltrovány, promyty vodou a etanolem, krystalizace byla provedena z vody.

Molekulová hmotnost : 139,1

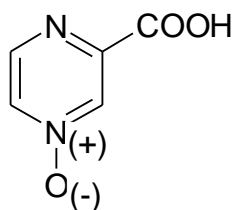
Teplota tání : 303°C

dle literatury 302 – 305°C

Výtěžek : 5,5 g (42,97 % teoretického výtěžku)



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



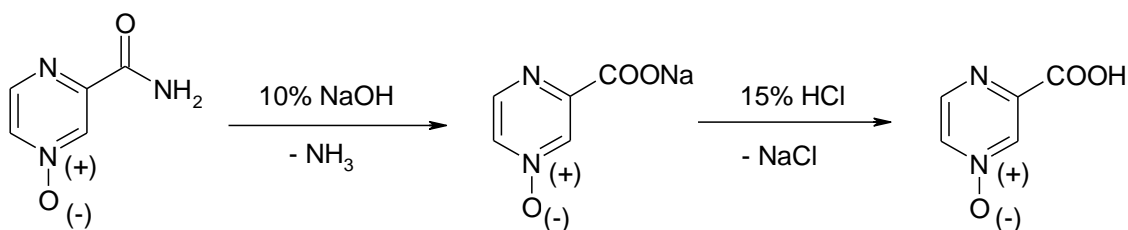
10,72 g (0,22 mol) 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny bylo 2 hodiny zahříváno s 37,3 ml (0,28 mol) 10% roztoku hydroxidu sodného. Vyloučené krystaly sodné soli 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly odfiltrovány a rozpuštěny v horké vodě, poté se roztok okyselil roztokem 15% kyseliny chlorovodíkové na pH 3. Vyloučený produkt byl krystalizován z vody.

Molekulová hmotnost : 140,1

Teplota tání : 196,5°C

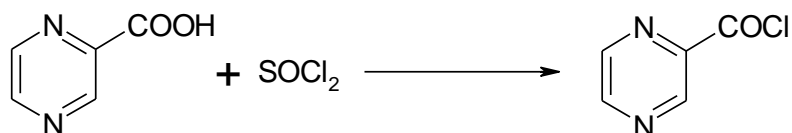
dle literatury 212-213°C

Výtěžek : 9,89 g (92,26 % teoretického výtěžku)



3.6. Obecný postup přípravy anlidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

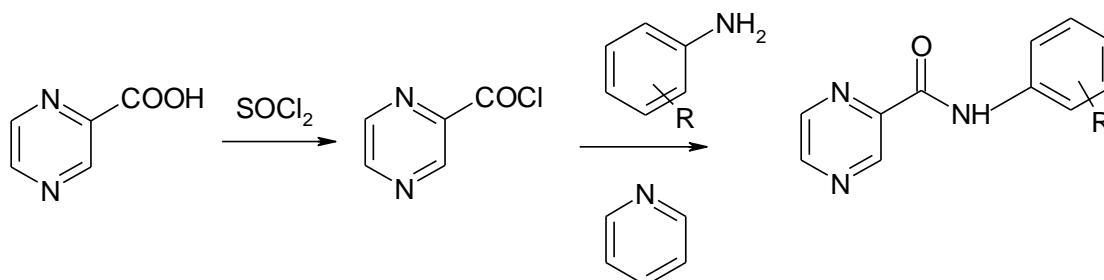
3.6.1. Příprava chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



0,0081 mol pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustí ve 25 ml vysušeného toluenu v baňce s kulatým dnem. Baňka je opatřena zpětným chladičem s uzávěrem proti vniknutí vzdušné vlhkosti. K roztoku se přidá 0,22 mol (16 ml) thionylchloridu a zahřívá se pod zpětným chladičem k varu při teplotě 120-125 °C 1,5 hodiny. Poté se nezreagovaný podíl thionylchloridu oddestiluje za sníženého tlaku. Po oddestilování na rotační vakuové odparce se na závěr přidá malé množství toluenu pro azeotropní oddestilování zbytku thionylchloridu z produktu. Surový produkt v baňce se dále nečistí, ale použije se k dalším reakcím.

Obdobným způsobem byly připraveny chloridy 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

3.6.2. Příprava anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny

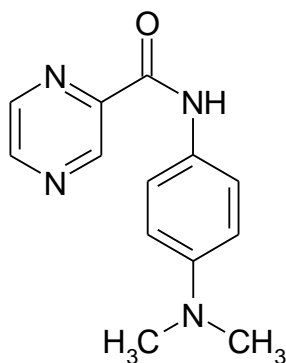


0,0027 mol substituovaného anilinu se rozpustí v 10 ml bezvodého acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku se přidá 0,0027 mol (0,23 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače se po kapkách přidává roztok 0,0027 mol chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém acetonu. Směs se míchá asi jednu hodinu při laboratorní teplotě. Poté se aceton oddestiluje za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Surový produkt se překrystalizuje ze směsi voda : ethanol. Následně se provede kontrola průběhu reakce pomocí TLC za použití vyvíjecí soustavy toluen : aceton (1:1). Na závěr se změří teplota tání získaného produktu.

Obdobným způsobem byly připraveny anilidy 4-*N*-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

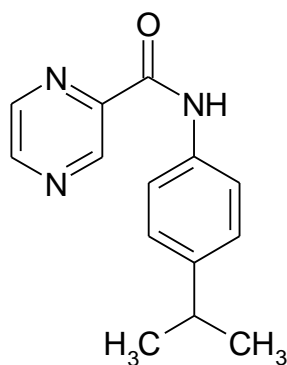
3.7. Nově připravené anilidy pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky

3.7.1. (4-dimethylaminofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



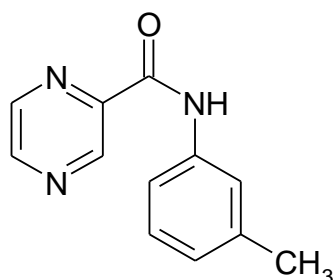
M. hm.	242,28
Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₄ N ₄ O
Barva	zelená
Výtěžek	0,1612g (25,04 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	201,5 °C
R_f	0,771
Čistota	98.87 %
Elementární analýza	vypočtená : C 64,45 % H 5,82 % N 23,12 % O 6,60 % naměřená : C 63,80 % H 6,065 % N 22,60 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3351 (NH), 1669 (C=O), 1578 (fenyl), 1526 (NH), 1446, 1358, 1020 (pyrazin)

3.7.2. (4-*iso*-propylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



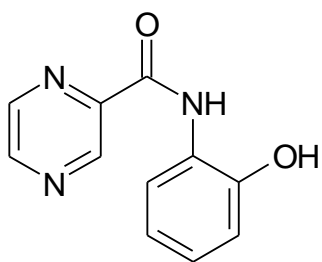
M. hm	241,30
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₅ N ₃ O
Barva	hnědo-oranžová
Výtěžek	0,300g (81,94 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	131,4 – 131,8 °C
R_f	0,819
Čistota	99.54 %
Elementární analýza	vypočtená : C 69,69% H 6,27% N 17,41% O 6,63% naměřená : C 70,30 % H 6,71 % N 17,345 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3352 (NH), 1671 (C=O), 1592 (fenyl), 1522 (NH), 1401, 1316, 1023 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.64 (1H, bs, NH), 9.30-9.26 (1H, m, H3), 8.83-8.90 (1H, m, H6), 8.82-8.87 (1H, m, H5), 7.82-7.75 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.27-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.95-2.77 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, J=7.0 Hz, CH ₃)
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	161.6, 147.8, 145.3, 144.6, 144.2, 143.4, 136.1, 126.6, 120.8, 33.1, 24.1

3.7.4. (3-methylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



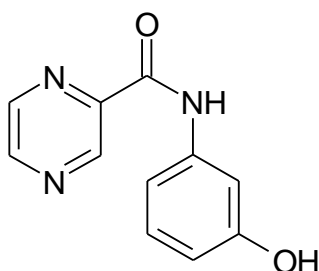
M. hm	213,24
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O
Barva	bílá
Výtěžek	0,120g (41,48 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	96,9 °C
R_f	0,790
Čistota	99,96 %
Elementární analýza	vypočtená : C 67,59 % H 5,20 % N 19,71 % O 7,50 % naměřená : C 67,255 % H 5,445 % N 19,73 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3255 (NH), 3147 (CH ₃), 1673 (C=O), 1593 (fenyl), 1547 (NH), 1404, 1122, 1022 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.61 (1H, bs, NH) 9,28 (1H, d, J=1.2 Hz, H3), 8.92 (1H, d, J=2.3 Hz, H6), 8.81-8.78 (1H, m, H5), 7.74 (1H, s, H2'), 7.66 (1H, d, J=7.9 Hz, H6'), 7.24 (1H, t, J=7.9 Hz, H5'), 6.95 (1H, d, J=7.9 Hz, H4'), 2.30 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	161.8, 147.9, 145.3, 144.2, 143.4, 138.2, 138.1, 128.7, 125.1, 121.2, 117.9, 21.4

3.7.5. (2-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



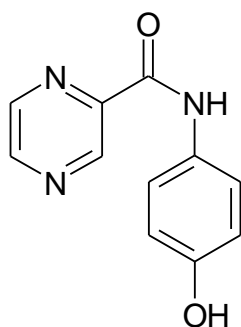
M. hm	215,21
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₂
Barva	fialovo-červená
Výtěžek	0,0545g (9,32 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	252,3 °C
R_f	0,781
Čistota	98.32 %
Elementární analýza	vypočtená : C 61,39 % H 4,22 % N 19,52 % O 14,87 % naměřená : C 60,945 % H 4,56 % N 18,115 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3355 (NH), 1684 (C=O), 1597 (fenyl), 1542 (NH), 1408, 1280, 1025 (pyrazin)

3.7.6. (3-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



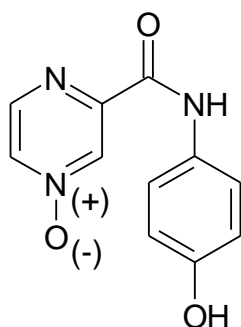
M. hm	215,21
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₂
Barva	okrově-bílá
Výtěžek	0,110g (18,93 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	177,4 – 177,7 °C
R_f	0,657
Čistota	99.73 %
Elementární analýza	vypočtená : C 61,39 % H 4,22 % N 19,52 % O 14,87 % naměřená : C 61,87 % H 4,77 % N 18,085 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3328 (NH), 1675 (C=O), 1615 (fenyl), 1548 (NH), 1269, 1161, 1025 (pyrazin)

3.7.7. (4-hydroxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



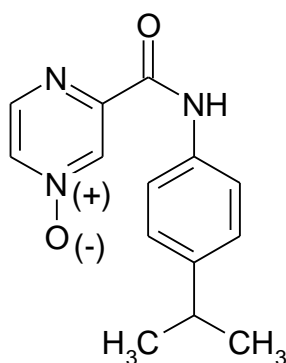
M. hm	215,21
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₂
Barva	hnědá
Výtěžek	0,080g (26,94 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	251,8 – 252,2 °C
R_f	0,600
Čistota	99.05 %
Elementární analýza	vypočtená : C 61,39% H 4,22%, N 19,52% O 14,87% naměřená : C 59,35 % H 4,39 % N 18,39 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3382 (NH), 1662 (C=O), 1603 (fenyl), 1541 (NH), 1438, 1272, 1021 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.50 (1H, bs, NH), 9.33 (1H, bs, OH), 9.27-9.24 (1H, m, H3), 8.89 (1H, d, J=2.3 Hz, H6), 8.78-8.76 (1H, m, H5), 7.70-7.60 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.80-6.70 (2H, m, AA', BB', H3', H5')
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	161.2, 154.3, 147.7, 145.5, 144.1, 143.4, 129.9, 122.4, 115.2

3.7.8. (4-hydroxyfenyl)amid 4-N-oxid-pyrazin-2-karboxylové kyseliny



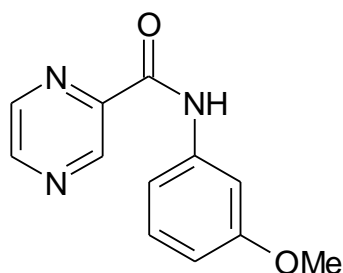
M. hm	233,23
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₃
Barva	černá
Výtěžek	0,450g (27,03 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	209,9 – 210,4 °C
R_f	0,500
Čistota	neměřeno
Elementární analýza	vypočtená : C 56,65 % H 4,75 % N 18,02 % O 20,58 % naměřená : C 56,89 % H 4,92 % N 17,72 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3331 (NH), 1683 (C=O), 1582 (fenyl), 1520 (NH), 1386, 1130, 1020 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	9.86 (1H, bs, NH), 9.43 (1H, bs, OH), 9.66 (1H, m, H3), 7.13 (1H, d, J=2.3 Hz, H6), 6.78-8.76 (1H, m, H5), 6.70-7.60 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 6.80-6.70 (2H, m, AA', BB', H3', H5')
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	162.2, 154.1, 149.7, 130.5, 124.1, 123.4, 119.9, 116.4, 115.2

3.7.9. (4-isopropylfenyl)amid 4-*N*-oxid-pyrazin-2-karboxylové kyseliny



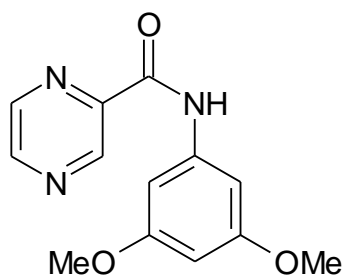
M. hm	259,31
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₂
Barva	skořicově hnědá
Výtěžek	0,120g (6,48 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	260,4 – 261,0 °C
R_f	0,933
Čistota	neměřeno
Elementární analýza	vypočtená : C 64,85 % H 6,61 % N 16,20 % O 12,34 % naměřená : C 65,06 % H 6,83 % N 15,89%
ÍČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3347 (NH), 2957 (<i>iso</i> -propyl), 1680 (C=O), 1590 (fenyl), 1529 (NH), 1390, 1312, 1021 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.61 (1H, bs, NH) 9, 28 (1H, d, J=1.2 Hz, H3), 8.92 (1H, d, J=2.3 Hz, H6), 8.81-8.78 (1H, m, H5), 7.74 (1H, s, H2'), 7.66 (1H, d, J=7.9 Hz, H6'), 7.24 (1H, t, J=7.9 Hz, H5'), 6.95 (1H, d, J=7.9 Hz, H4'), 2.30 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	162.6, 149.9, 146.3, 145.2, 144.0, 135.2, 126.1, 126.1, 121.2, 121.2, 117.9, 33,2, 23.4, 23.4.

3.7.10. (3-methoxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



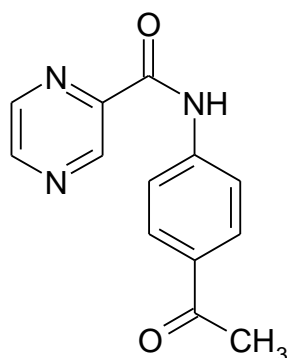
M. hm	229,24
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₁₁ N ₃ O ₂
Barva	zeleno-hnědá
Výtěžek	0,130g (7,00 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	100,9 – 101,4 °C
R_f	0,771
Čistota	99.75
Elementární analýza	vypočtená : C 62,87 % H 4,84 %, N 18,33 % O 13,96 % naměřená : C 58,49 % H 5,435 % N 16,60 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3517 (NH), 1674 (C=O), 1596 (fenyl), 1548 (NH), 1248, 1168, 1046 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.68 (1H, bs, NH) 9,30-9.27 (1H, m, H3), 8.94-8.90 (1H, m, H6), 8.82-8.77 (1H, m, H5), 7.62-7.55 (1H, m, H2'), 7.50 (1H, d, J=7.9 Hz, H4'), 7.26 (1H, t, J=7.9 Hz, H5'), 6.75-6.68 (1H, m, H6'), 3.75 (3H, s, OCH ₃)
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	161.9, 159.6, 147.9, 145.2, 144.3, 143.4, 139.5, 129.7, 112.9, 110.0, 106.4, 55.2

3.7.11. (3,5-dimethoxyfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



M. hm	259,27
Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ O ₃
Barva	šedo-hnědá
Výtěžek	0,180g (8,57 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	134,1 – 134,6 °C
R_f	0,800
Čistota	99,36 %
Elementární analýza	vypočtená : C 60,23% H 5,05 % N 16,21% O 18,51% naměřená : C 59,98% H 4,84 % N 16,02 %
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3450 (NH), 1680 (C=O), 1611 (fenyl), 1519 (NH), 1271, 1189, 1142 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	10.38 (1H, bs, NH), 9.86 (1H, m, H3), 8.90 (1H, m, H6), 8.83 (1H, m, H5), 6.92 (1H, m, H2'), 6.61 (1H, d, J=7.9 Hz, H4'), 6.92 (1H, m, H6'), 3.75 (3H, s, OCH ₃), 3.75 (3H, s, OCH ₃).
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	162.9, 160.6, 160.6, 145.9, 145.2, 144.7, 144.6, 137.5, 102.9, 102.9, 96.4, 55.2, 55.2.

3.7.12. (4-acetylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



M. hm	241,25
Sumární vzorec	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₂
Barva	bílo-šedá
Výtěžek	0,070g (10,75 % teoretického výtěžku)
Teplota tání	249,8 – 249,9 °C
R_f	0,790
Čistota	99.09 %
Elementární analýza	vypočtená : C 64,72 % H 4,60 % N 14,72 % O 13,26 % naměřená : C 64,58 % H 4,48 % N 14,66%
IČ spektrum (KBr), cm⁻¹	3428 (NH), 1689 (C=O), 1597 (fenyl), 1519 (NH), 1270, 1191, 1138 (pyrazin)
¹H NMR (300 MHz, DMSO), δ	11.05 (1H, bs, NH) □ , 9.31 (1H, d, J=1.5 Hz, H3), 8.95 (1H, d, J=2.6 Hz, H6), 8.83 (1H, dd, J=2.6 Hz, J=1.5 Hz, H5), 8.11-8.03 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 8.02-7.95 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 2.55 (3H, s, CH ₃)
¹³C NMR (75 MHz, DMSO), δ	196.9, 173.3, 148.1, 145.0, 111.4, 143.5, 142.7, 132.7, 129.5, 120.1, 26.7

4. BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ

4.1. Antituberkulotická aktivita

Nově syntetizované deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na účinnost proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv v rámci mezinárodního programu určeného pro testování nových antituberkulotik TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility). Antimykobakteriální aktivita se testuje na *M. tuberculosis* H₃₇Rv v BACTEC 12B mediu použitím BACTEC 460 radiometrického systému.¹⁹

Tabulka č. 4 : Hodnoty antimykobakteriální aktivity

Testovaná látka č.	% inhibice při 6,25 µg/ml
1.	-
2.	90
3.	33
4.	76
5.	-
6.	32
7.	41
8.	-
9.	-
10.	68
11.	-
12.	49

Pozn. látky s neuvedeným % inhibice – výsledky nejsou dosud k dispozici

4.2 Antimykotická aktivita

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

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640 s glutaminem (medium; zkratka z angl. Rockwell Park Memorial Institute), roztok byl pufován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS (systematicky: 3-(morfolino)propansulfonová kyselina). Konečné koncentrace látek se pohybovaly

v rozmezí od 1000 do 0,975 μM . Součástí testování byly slepé pokusy (bez účinné látky). MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Inkubace probíhala staticky, ve tmě, ve vlhké atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

Vybrané sloučeniny byly testovány na aktivitu proti kmenu (kód, číslo):²⁰

Candida albicans ATCC 44859 (CA1) *Trichosporon asahii* 1188 (TA)
C. tropicalis 156 (CT) *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM)
C. krusei E28 (CK2) *Aspergillus fumigatus* 231(AF)
C. glabrata 20/I (CG) *Absidia corymbifera* 272 (AC)

Tabulka č. 5 : Hodnoty MIC/IC₈₀ v terapii běžně používaného flukonazolu

Testované kmeny	MIC/IC ₈₀ [$\mu\text{mol/l}$]							
	CA	CT	CK	CG	TA	TM	AF	AC
Délka inkubace	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	72 h	24 h	24 h
	48 h	48 h	48 h	48 h	48 h	120 h	48 h	48 h
flukonazol	0,06	0,12	3,91	0,98	0,24	1,95	>125	>125
	0,12	>125	15,62	3,91	0,48	3,91	>125	>125

Tabulka č. 6 : Hodnoty antimykotické aktivity

KMEN (kód)		Testovaná látka (č.) - MIC/IC ₈₀ [$\mu\text{mol/l}$]											
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
CA1	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
CT	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
CK2	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
CG	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
TA	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
TM	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
AF	24h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
	48h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>125
AC	72h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	250	>500	>500	500	>125
	120h	>500	>125	>500	>500	>250	>500	>500	500	>500	>500	500	>125

4.3. Herbicidní aktivita

4.3.1. Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu

Chloroplasty byly připraveny metodou dle Walkera²¹ z rostliny špenátu (*Spinacia oleracea*). Inhibice přenosu elektronů při fotosyntéze v chloroplastech špenátu byla stanovena spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) za použití 2,6-dichlorfenol-indofenolu (DCIPP) jako akceptoru elektronů metodikou Kráľové¹⁹. Testované látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). DMSO v použité koncentraci (nejvýše 4 %) neovlivňuje fotochemické pochody v chloroplastech špenátu. Účinnost inhibice testovaných látek je vyjádřena jako IC₅₀, což odpovídá molární koncentraci látky způsobující 50% pokles produkce kyslíku oproti kontrolní skupině. Jako standard byl použit selektivní herbicid DCMU.

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

4.3.2. Testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*

Zelená řasa *Chlorella vulgaris* byla kultivována při pokojové teplotě metodou dle Kráľové.²² Účinek sloučenin na obsah chlorofylu v řasách byl zjišťován po 4-denní kultivaci řas v přítomnosti sledované látky, výsledek byl stanoven spektrofotometricky (Kontron Uvikon 800, Kontron, Muenchen, Germany) po extrakci chlorofylu methanolem podle Wellburna²³. Látky byly z důvodu nízké rozpustnosti ve vodě rozpuštěny v DMSO, kontrolní vzorky obsahovaly stejné množství DMSO jako testované. Antialgální aktivita je vyjádřena jako IC₅₀, jako standard byl použit DCMU.

Tabulka č. 7 : Herbicidní aktivita připravených látek ve srovnání s účinností standardu DCMU

Testovaná látka č.	Inhibice fotosyntézy (<i>Spinacia oleracea</i>)	Redukce obsahu chlorofylu (<i>Chlorella vulgaris</i>)
	IC ₅₀ (mmol/l)	IC ₅₀ (mmol/l)
1	a	a
2	a	a
3	a	a
4	a	0,311
5	a	a
6	a	0,978
7	a	a
8	a	a
9	a	a
10	a	0,479
11	a	a
12	a	a
DMCU	0,0019	0,0073

^a látky dosud nebyly změřeny

5. Diskuse

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na přípravu na syntézu látek ze skupiny anilidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Cílem bylo studovat vliv substituentů na aromatickém jádře. Látky podobného typu byly v minulosti testovány na anthelmintickou aktivitu,²⁴ nás nyní zajímaly především antituberkulotická, antifungální a herbicidní aktivita.

Celkem jsem připravila 12 látek, které lze rozdělit do dvou skupin:

1. anilidy pyrazinkarboxylové kyseliny
2. anilidy 4-*N*-oxidu-pyrazin-2-karboxylové kyseliny.

Látky byly připraveny reakcí chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny a příslušného aminu. Syntézy byly prováděny ve dvou stupních:

1. příprava chloridu pyrazin-2-karboxylové kyseliny v bezvodém toluenu,
2. vlastní syntéza anilidu příslušné kyseliny aminolýzou.

Reakce probíhaly většinou hladce a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 6,48 – 81,94 % v závislosti na reaktivitě substituovaného anilinu.

Finální látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, ¹H a ¹³C NMR spektry, popř. i elementární analýzou. Čištění látek jsem prováděla rekrystalizací ze směsi voda/ethanol.

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

Log *P* a Clog *P* sloučenin byl získán pomocí programů ACD/log *P* verze 1.0. (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada) a CS ChemOffice Ultra verze 9.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A.). Hodnota Clog*P* je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě *n*-oktanol/voda, při jehož výpočtu jsou brány v úvahu možné chemické interakce. Hodnota log *P* je logaritmus rozdělovacího koeficientu v soustavě *n*-oktanol/voda. Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí log *P* -1,68 až 1,82 a Clog *P* -0,52 až 2,89.

Dále byla určena hodnota kapacitního faktoru *K* za použití HPLC (Waters Alliance 2695 XE a Waters Photodiode Array Detector 2996). Jako mobilní fáze byla

použita směs methanolu p.a. (70 %) a vody (30 %). Detekce probíhala spektrofotometricky při 210 nm. Byl změřen retenční čas T_R (vzdálenost od nástřiku k maximu píku) a mrtvý retenční čas T_D (vzdálenost od nástřiku k maximu píku nesorbované látky: použit roztok KI v methanolu). Kapacitní faktor byl spočítán použitím programu Millennium 32^R podle vzorce:

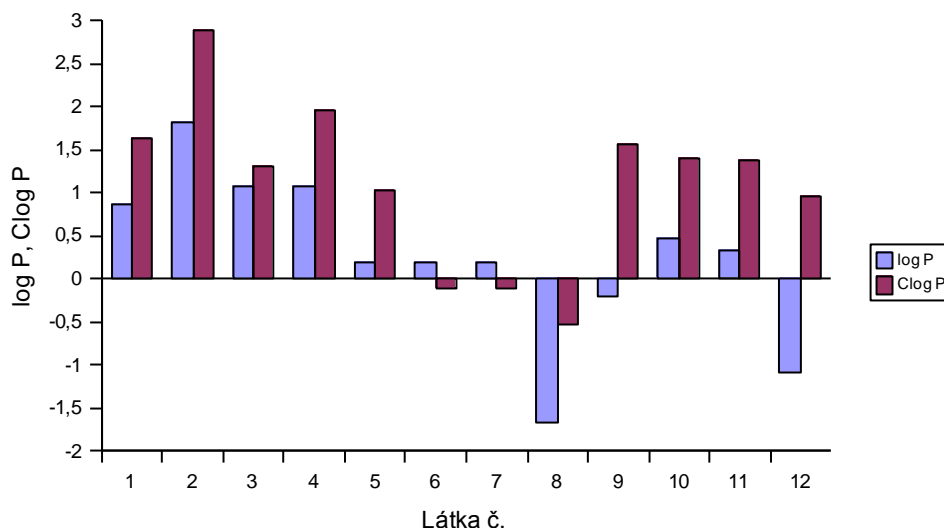
$$K = \frac{T_R - T_D}{T_D}$$

Log K je pak spočítán z kapacitního faktoru K .

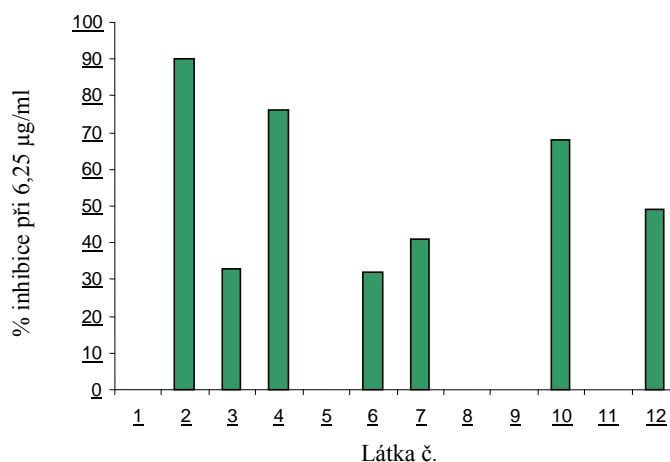
Tabulka č. 8 : Vypočítané lipofility ($\log P$) a chromatograficky stanoveného $\log K$

Látka	$\log K$	$\log P$	$\log P/C\log P$
1.	0.5979	1.28 ± 0.41	0.87 / 1.62948
2.	0.7152	2.48 ± 0.40	1.82 / 2.89148
3.	0.4716	1.60 ± 0.40	1.08 / 1.31348
4.	0.4583	1.60 ± 0.40	1.08 / 1.96348
5.	0.3695	0.77 ± 0.40	0.20 / 1.02748
6.	0.3061	0.78 ± 0.40	0.20 / -0.11152
7.	0.3039	0.39 ± 0.40	0.20 / -0.11152
8.	a	-1.18 ± 0.40	-1.68 / -0.522
9.	a	-0.02 ± 0.40	-0.21 / 1.572
10.	0.4617	1.30 ± 0.40	0.46 / 1.40264
11.	0.4617	2.06 ± 0.40	0.34 / 1.37934
12.	0.3791	1.02 ± 0.41	-0.10 / 0.960957

^a látky dosud nebyly změřeny



Antituberkulotická aktivita



Z grafů je patrné, že s rostoucí lipofilitou roste i procento antimykobakteriální inhibice (tj. antituberkulotická aktivita).

Všech 12 látek bylo odesláno na testování **antimykobakteriální aktivity** do TAACF, v USA. Pouze u sedmi látek jsou dostupné výsledky v době odevzdání této diplomové práce. U ostatních zatím nejsou k dispozici. Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu *in vitro* vykazuje látka číslo 2 ((4-isopropylfenyl)amid pyrazinkarboxylové kyseliny), procento inhibice činí 90 %. Zjištěné procento inhibice je velmi vysoké, vhodné pro další testování v rámci programu TAACF. Tato látka představuje vysoce lipofilní sloučeninu v dané skupině látek (log *P* 1,82; Clog *P* 2.89148). Látka číslo 4 ((3-methylfenyl)amid kyseliny pyrazinkarboxylové) vykazuje další vysoké procento inhibice 76 %, ale pro další testování je nevhodná, neboť je nutná minimální 90 %

inhibice. Naopak nejmenší procento inhibice vykazuje látka číslo **6** ((3-hydroxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové).

Dále byly látky podrobeny testování na **antimykotickou aktivitu**. Žádná látka nevykazovala specifickou inhibici. Velmi slabá aktivita byla zjištěna u látek **11**, popř. **8**, které MIC/IC₈₀ = 250/500 μmol/l proti *Absidia corymbifera*.

Testování herbicidní aktivity, tj. testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu a testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris* dosud nebylo ukončeno, částečné výsledky přináší tabulka na str. 50. V sérii připravených látek nebyla zatím nalezena žádná významná aktivita.

Význam přítomnosti *N*-oxidu (u dvou připravených derivátů **8** a **9**) pro biologický účinek nelze dosud zhodnotit z důvodu jejich nedokončeného testování.

6. Závěr

V rámci této diplomové práce jsem plnila následující úkoly:

1. S použitím dostupné odborné literatury a internetu jsem provedla rešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě a trendy v terapii.
2. V dostupné chemické literatuře jsem zjistila metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravila jsem tyto produkty:
 - 1) (4-dimethylaminofenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 2) (4-*iso*-propylfenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 3) (2-methylfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 4) (3-methylfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 5) (2-hydroxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 6) (3-hydroxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 7) (4-hydroxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 8) (4-hydroxyfenyl)amid kyseliny 4- N-oxid-pyrazin-2-karboxylové
 - 9) (4-*iso*-propylfenyl)amid kyseliny 4-N-oxid-pyrazin-2-karboxylové
 - 10) (3-methoxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 11) (3,5-dimethoxyfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové
 - 12) (4-acetylfenyl)amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové

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

4. Látky byly podrobeny *in vitro* biologickému hodnocení. Získala jsem údaje o antimykobakteriální, antifungální aktivitě a výsledky testů herbicidní aktivity (testy inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu a testy redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*).
5. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log *P* nově připravených látek: Log *P* připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí -1,68 až 1,82.
6. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou připravených látek (viz. Diskuse).

Jaroslava Pagáčová: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva II.

Klíčová slova : tuberkulóza, *Mycobacterium tuberculosis*, Directly Observed Treatment Strategy, Multi Drug Resistance, kyselina pyrazinkarboxylová, pyrazinamid, isoniazid, rifampicin, streptomycin, ethambutol

Abstrakt: V rámci diplomové práce jsem provedla rešerši zaměřenou na současný význam tuberkulózy ve světě a na nejnovější trendy v terapii. V chemické literatuře jsem zjišťovala metody přípravy substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Syntetizovala jsem dvanáct dosud nepopsaných látek charakteru substituovaných amidů pyrazinkarboxylové kyseliny. Všechny produkty byly charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ, ^1H , ^{13}C NMR spektry. Série látek byla podrobena *in vitro* biologickému hodnocení. Práce přináší nové údaje o antimykobakteriální a antifungální aktivitě. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabelární i grafické podobě. Jsou uvedeny i vypočtené hodnoty $\log P$ nově připravených látek. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek.

Jaroslava Pagáčová: Pyrazine derivates as potential drugs II.

Keywords : tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Directly Observed Treatment Strategy, Multi drug Resistance, pyrazinoic acid, pyrazinamide, isoniazide, rifampicine, streptomycine, ethambutol

Abstract of Diploma Thesis: This review is about worldwide problem of tuberculosis and about new trends in its treatment. Also chemical search about drugs and their preparing was done. The synthetic approach, analytical, spectroscopic, lipophilicity and biological data of twelve newly synthesized compounds were presented. Products were characterized and tested against *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv and against eight fungal pathogen strains. Structure-activity relationships among the chemical structure, lipophilicity (log *P*), and their biological activity of the evaluated compounds were discussed as well.

7. Seznam literatury

1 Zatloukal P.: Tuberkulóza, *Lékařské listy*, příloha Zdravotnických novin, číslo 2, **2007**, ročník 56, str. 30–33.

² Tripathi R. P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V. K. : Fighting Tuberculosis : An Old Disease with New Challenges, *Medical Research Reviews*, **2005**, vol. 25, No. 1, p. 93-131.

³ Havelková M.: *Tuberkulóza*, 2004, staženo [27.2.2007] dostupné z <<http://www.szu.cz/Menu1/verejnost/tuberkuloza.html>>.

⁴ dostupné z <<http://images.google.com.cz/images?q=tuberculosis>>, staženo [21.9.2006].

⁵ SOLUTIO příruční kniha pro lékárníky 2000/2001, *Tuberkulóza*, Medon s.r.o., **2000**, str. 65-70, ISBN 80-902122-6-3.

⁶ Jílek P., Buchta V., Kubanová P., Förstl M.: Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví, Karolinum, Praha, **2002**, str. 27-29, ISBN: 80-246-0459-0.

⁷ *Očkovací látky pro pravidelné očkování v ČR*, [online] poslední revize 17.1.2005, staženo [17.2.2007], dostupné z <http://www.szu.cz/cem/>.

⁸ Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: *Farmakologie a toxikologie*, Avicenum, Grada Publishing s.r.o. **2002**, str. 503-508.

⁹ Katzung B.G. : *Základní a klinická farmakologie*, Nakladatelství a vydavatelství H&H, **1994**, 5. vydání, str. 685-690, ISBN 80-85787-35-0.

¹⁰ Lincová D., Farghali H. et. al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Praha Galén, Karolinum **2005**, str. 461-463, ISBN 80-72621-68-8.

¹¹ Zhang Y., Wade M. M., Scorpio A., Zhang H., Sun Z.: Mode of action of pyrazinamide : disruption of Mycobacterium tuberculosis membráně transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, October **2003**, vol. 52, p. 790-795.

¹² Zhang Y., Post-Martens K., Denkin S.: New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy, In *Drug Discovery Today*, January **2006**, vol. 11, No. 1/2, p. 21-27.

¹³ Požarskij, A.F.: In *Chim. Geterocikl. Soedin.* **1987**, vol 7, p. 867.

¹⁴ Pratt, Y.T.: The Pyrazines and Piperazines. In: Elderfield R. C.: *Heterocyclic Compounds*, **1957**, vol. 6, p. 377, Willey & Sons, Inc., New York.

-
- ¹⁵ Palmer, M.H.: *The Structure and Reactions of Heterocyclic Compounds*, Edward Arnold Publisher Ltd., London **1967**, pp. 105-144.
- ¹⁶ Klein B., Hetman N. E., O'Donnel M. E.: Pyrazines. III. The Action of Phosphoroyl Chloride on Pyrazine N-Oxides, *The Journal of Organic Chemistry*, **1963**, vol. 28, p. 1682-1686.
- ¹⁷ Červinka, O. a kol.: *Chemie organických sloučenin*, 1. vydání, 2.díl, SNTL/ALFA, Praha, **1987**, str. 49 - 50, 73–76.
- ¹⁸ Hrabálek A. a kol.: *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*, UK v Praze, Karolinum **2002**, str. 86-87, ISBN 80-7184-968-5.
- ¹⁹ Kráľová K., Šeršeň F., Sidoová E.: *Chemical Papers*, **1992**, vol. 46, p. 348.
- ²⁰ Doležal M., Vičík R., Miletín M., Kráľová K.: *Chemical Papers*, **2000**, vol. 54, p. 245
- ²¹ Walker D.A. : Preparation of higher plant chloroplasts, *Methods in Enzymology Part C*, San Pietro ed, Academic Press : New York, **1980**, vol. 69, p. 94-104.
- ²² Kráľová K., Šeršeň F., Melnik M. J.: Inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* by Cu(II) complexes with biologically active ligands. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*. Taylor & Francis **1998**, vol. 16, p. 491–500.
- ²³ Wellburn, A. R., *Journal of Plant Physiology*, **1994**, vol. 144, p. 307.
- ²⁴ Vontor T., Palát K., Daněk J., Lyčka, A.: Anthelmintic agents. II. Substituted anilides and thioanilides of 2-pyrazinecarboxylic acids. *Cesko-Slovenska Farmacie*, **1989**, vol. 38(9), p. 393-7.