

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.

Hradec Králové, 2006

Zuzana Röslerová

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

OBSAH

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	4
1 ÚVODNÍ ČÁST.....	5
1.1 TUBERKULÓZA.....	5
1.2 PREVENCE.....	7
1.3 TERAPIE TUBERKULÓZY.....	7
1.3.1 Antituberkulotika.....	9
1.3.1.1 Antituberkulotika první volby.....	9
1.3.1.2 Další v současnosti používané antituberkuloticky aktivní látky.....	11
1.3.1.3 Látky ve vývoji.....	15
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
2.1 VLASTNOSTI PYRAZINOVÉHO JÁDRA.....	18
2.2 PŘÍPRAVA N-OXIDŮ PYRAZINU.....	19
2.3 HALOGENACE PYRAZINOVÉHO JÁDRA.....	20
2.4 PŘÍPRAVA ACYLHALOGENIDŮ.....	20
2.5 PŘÍPRAVA ANILIDŮ KARBOXYLOVÝCH KYSELIN.....	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1 PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE.....	23
3.2 SCHÉMA PROVÁDĚNÝCH REAKCÍ.....	24
3.2.1 Příprava výchozích pyrazin-2-karboxylových kyselin.....	24
3.2.2 Příprava vlastních anilidů.....	24
3.3 PŘÍPRAVA PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	25
3.4 PŘÍPRAVA 4-OXIDU AMIDU PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	26
3.5 PŘÍPRAVA 4-OXIDU PYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	27
3.6 PŘÍPRAVA 5-TERC.BUTYLPYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	28
3.7 PŘÍPRAVA 6-CHLORPYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	29
3.8 PŘÍPRAVA 5-TERC.BUTYL-6-CHLORPYRAZIN-2-KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	30
3.9 OBECNÝ POSTUP PŘÍPRAVY ANILIDŮ SUBSTITUOVANÉ PYRAZIN-2- KARBOXYLOVÉ KYSELINY.....	31
3.9.1 Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	31
3.9.2 Obecný postup přípravy anilidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	31
3.10 NOVĚ PŘIPRAVENÉ ANILIDY SUBSTITUOVANÉ PYRAZIN-2- KARBOXYLOVÉ KYSELINY A JEJICH CHARAKTERISTIKY.....	33
1. 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	33
2. 2-fluoranilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	33
3. 2-fluoranilid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	34
4. 2-fluoranilid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	34
5. (4-merkaptofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	35
6. (4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	35
7. (4-merkaptofenyl)amid 5-terc.butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	36
8. (4-merkaptofenyl)amid 5-terc.butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny.....	36
4 BIOLOGICKÉ HODNOCENÍ.....	37
4.1 ANTITUBERKULOTICKÁ AKTIVITA.....	37
4.2 ANTIMYKOTICKÁ AKTIVITA.....	37
4.3 HERBICIDNÍ AKTIVITA.....	39
4.3.1 Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech špenátu.....	39
4.3.2 Testování redukce obsahu chlorofylu v <i>Chlorella vulgaris</i>	39
5 DISKUSE.....	40
6 ZÁVĚR.....	42
7 SEZNAM LITERATURY.....	43

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

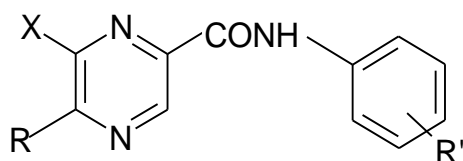
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se dlouhodobě zabývá studiem syntézy nových derivátů pyrazinu s potenciálním antimykobakteriálním a antifungálním účinkem. Doplňkově je u nově připravených látek zjišťována jejich schopnost inhibovat fotosyntézu. Tato diplomová práce je dílčím příspěvkem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

Cílem diplomové práce je pokusit se připravit biologicky (tj. antifungálně a především antimykobakteriálně) aktivní deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Tato práce navazuje na výsledky prezentované na fakultním kole Studentské vědecké konference v roce 2005.¹ Mé dílčí výsledky byly uvedeny v publikaci z roku 2004: Substituted Pyrazinecarboxamides.

Konkrétními úkoly bylo:

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 pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravit substituované amidy pyrazin-2-karboxylové 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.

Obecný vzorec připravovaných látek:



X = H, Cl

R = H, *tert*-butyl

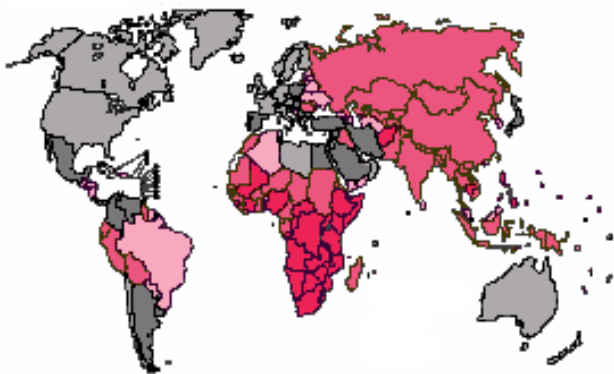
R' = 2-F, 4-SH

1 ÚVODNÍ ČÁST

1.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC) je vážné infekční onemocnění, jehož původcem je mikroorganismus *Mycobacterium tuberculosis*, postihující nejčastěji dýchací systém. Tuberkulózními mykobakteriemi je infikována asi jedna třetina lidstva, tj. 1,7 miliardy jedinců. Každoročně je hlášeno celosvětově asi 8 miliónů nových onemocnění, z toho 95 % v rozvojovém světě a 5 % připadá na vyspělé státy. Na TBC umírá ročně asi 2,9 miliónů osob.³

Obr.1. Země s nejčastějším výskytem TBC

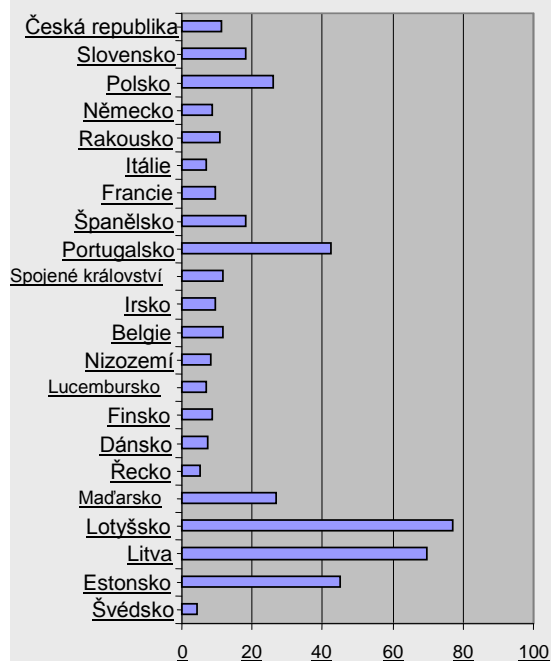


Epidemiologická situace je však v různých zemích odlišná. Ze zemí střední a východní Evropy patří Česká republika mezi země s nejnižším ročním výskytem tuberkulózy (zhruba 20 případů onemocnění na 100.000 obyvatel) ve srovnání s průměrným ročním výskytem v Západní Evropě (25 případů na 100.000 obyvatel).

Celosvětový vzrůst počtu tuberkulózou postižených osob je přičítán vysokému počtu HIV pozitivních osob, které mají postižený imunitní systém a mohou být velmi snadno nakaženy tuberkulózou. Takto může docházet k vytváření lidského zdroje nákazy.⁵

V roce 1993 WHO (World Health Organization – Světová zdravotnická organizace) vyhlásila TBC za nemoc ohrožující zdraví lidí po celém světě. 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.⁴

Výskyt TBC v Evropě na 100 000 obyvatel



Primárním zdrojem nákazy je životaschopný tuberkulózní bacil *Mycobacterium tuberculosis*. Vyvinul se z půdní bakterie před více než 10 000 lety.⁸ Jde o pomalu rostoucí, aerobní, nesporulující, nepohyblivou, grampozitivní, acidorezistentní tyčku o velikosti 0,3-1,5 µm. Jako původce tuberkulózy byl objeven roku 1882 Robertem Kochem (tzv. Kochův bacil).⁷

Obr.č.2 Fotografie *M. tuberculosis*



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

Ke kontaminaci vzduchu tuberkulózním bacilem dochází při kýchní, kašlání, křičení, či zpívání pacienta s aktivní TBC. Jejich následné vdechování vede k nákaze bronchiolů a alveol. Poté co se inhalované bakterie pomnoží, vytvořené protilátky aktivují T-lymfocyty. Ložiska TBC jsou přetvářena, protože se na straně infekce hromadí makrofágy. Tato reakce může vést k úplnému potlačení choroby, vyléčení tzv. primární tuberkulózy, nebo některé mikroby mohou v ložisku přežít a stát se zdrojem postprimární infekce. Ta vzniká nejčastěji při poklesu imunity nebo při reinfekci člověka (vdechnutí velkého množství nových bakterií). Mikroorganismy uvolněné z ložisek či makrofágů cirkulují lymfatickým a krevním řečištěm do různých částí těla a infikují retikuloendotelový systém (játra, slezinu, lymfatické uzliny) a bohatě prokrvené orgány (plíce, kůru ledvin, epifýzy rostoucích kostí). Následné pomnožení mykobakterií na těchto místech vede ke vzniku velkého počtu ložisek po celém těle. Tento typ infekce je nazýván miliární tuberkulóza. U některých pacientů vede tato ložisková forma k dočasnému skrytí infekce, mezitím však mykobakterie přežívají. Při kašlání pak vytvořené sputum obsahuje aktivní mikroorganismy, které jsou buď pacientem spolknuty, nebo vdechovány zdravými lidmi. K následné nákaze dochází při kontaktu s nemocnými lidmi nebo při pobytu v prostorách, kde se nemocný nacházel.⁸

V průměru každý nemocný s aktivní TBC nakazí 10 až 15 lidí ročně. TBC je řazena mezi tzv. sociální choroby. Nejčastěji postihuje osoby staré, opuštěné, tělesně a duševně zanedbané, vězně, alkoholiky, osoby oslabené, chronicky nemocné.⁶

Na léčbu antituberkulotiky celkem dobře reagují infekce horních cest dýchacích, hltanu, průdušnice a průdušek, pouze částečně úspěšná je léčba tuberkulózy gastrointestinálního a močového traktu nebo lymfatických uzlin.⁸

Původci klasické tuberkulózy člověka jsou *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* a vzácně i *M. africanum*, mezi „atypická“ mykobakteria jsou řazena *M. kansasii*, *M. avium intracellulare*, *M. ulcerans*, která jsou potencionálními oportunními patogeny.

1.2 Prevence

Kromě zvyšování celkové životní a hygienické úrovně obyvatelstva a izolace nemocných s otevřenou TBC, je k dispozici ochranné očkování. První úspěšné očkování bylo provedeno v roce 1921 aplikací BCG-vakcíny (avirulentní *Bacillus-Calmette-Guerin*). Tato vakcína je laciná, bezpečná a vhodná pro podání dětem. Je vyzkoušeno, že BCG má protektivní efekt na děti a je účinná proti meningitidní formě TBC, neochrání však před plicní TBC.⁸

Očkovací látku tvoří lyofilizát bakteriálních zárodků *Mycobacteria bovis*, které se získávají pomnožením vhodného atenuovaného kmene na umělém kultivačním médiu.

V České republice patří očkování BCG vakcínou mezi očkování povinná. Důkazem nutnosti a prospěšnosti očkování proti tuberkulóze byla situace, ke které došlo po zastavení očkování v roce 1986. Vakcínu obdrželi pouze novorozenci rizikových rodin a děti rodičů, kteří si očkování vyžádali. Vzhledem k zvýšenému výskytu TBC u neočkovaných dětí bylo toto očkování od roku 1994 opět zavedeno jako povinné.⁵

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 kyselinou.⁸

1.3 Terapie tuberkulózy

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

V terapii používaná antituberkulotika nejsou proti této nemoci dostatečně efektivní, protože vznikají nové rezistentní kmeny mykobakterií (neprostupnost buněčné stěny pro řadu léčiv, dobře vyvinutý „eflux“ léčiva z buňky, produkce enzymů rozkládajících léčivo, mutace chromozomů). Proto je kladen důraz na vývoj nových způsobů terapie:

- a) studie genomu mykobakterií, jehož poznání umožní vysvětlit specifické mykobakteriální funkce a vytvořit tak nový pohled na cílové místo účinku léčiv,
- b) 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 zameřeny na *Mycobacterium vaccae*, které je považováno za silný TH1 adjuvant.

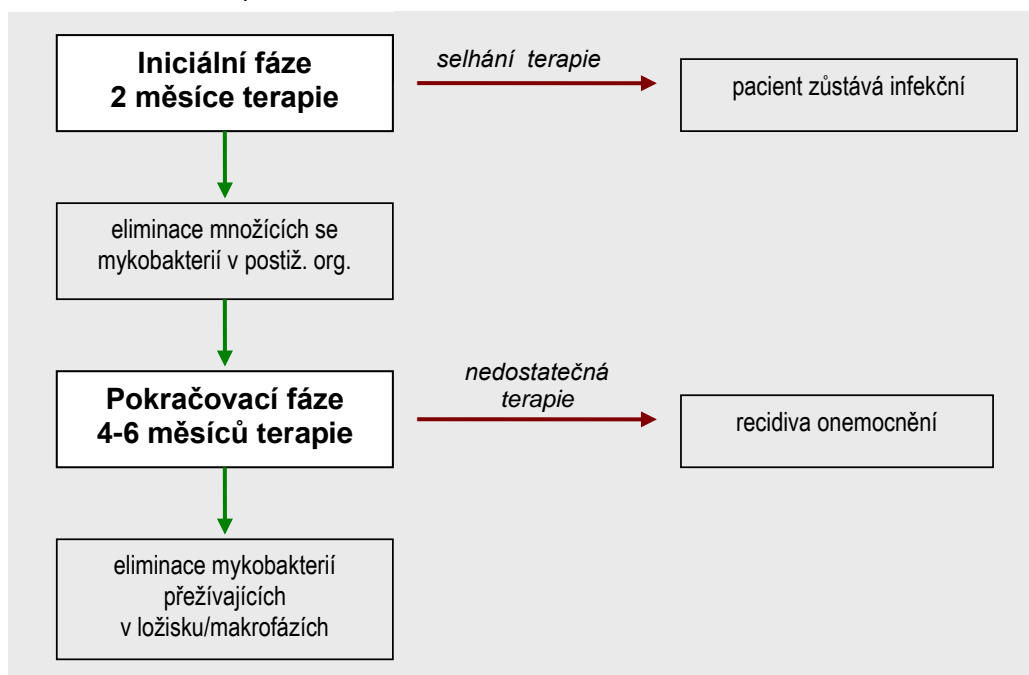
c) chemoterapie- byla zahájena již ve 40. letech 20. století. V této době byla objevena celá řada v současnosti používaných léčiv. V terapii se používají kombinace více léčiv, přičemž isoniazid a rifampicin jsou základní složkou moderní chemoterapie.

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).⁸

Základem úspěšné léčby TBC je kombinace účinku několika baktericidních a bakteriostatických léků, které při současném podávání debacilizují nemocného již po 3-6 měsících a zamezují také vývoji lékové rezistence. Nejúčinnějším léčebným režimem se stává krátkodobá šestiměsíční přímo kontrolovaná léčba, při které se v iniciální dvouměsíční fázi podává isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol a v pokračující čtyřměsíční fázi isoniazid, rifampicin (viz. obrázek č. 3). Striktním požadavkem tohoto režimu je přímá kontrola přijímání léků zdravotnickým personálem. U nemocných vylučujících rezistentní mykobakteria je nutno podávat léky vybrané individuálně podle testů citlivosti in vitro. Pro léčbu polyrezistentní TBC se zatím nepodařilo vypracovat spolehlivý léčebný režim a prognóza nemocných je nepříznivá.³

Obr. č.3 Schéma terapie TBC

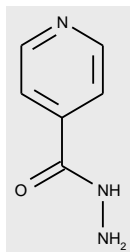


1.3.1 Antituberkulotika

1.3.1.1 Antituberkulotika první volby

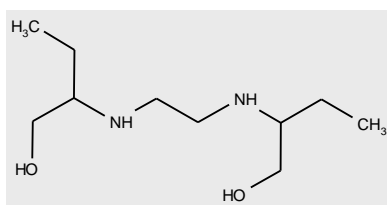
Následující účinné látky se standardně používají při léčbě tuberkulózy.^{8,9}

Isoniazid



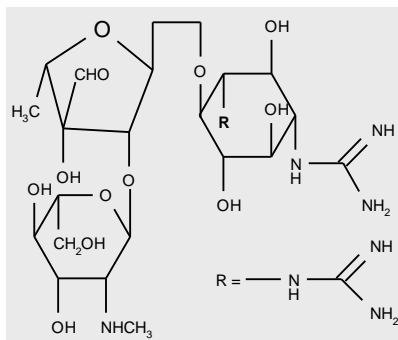
Typ léčiva	proléčivo (aktivace pomocí mykobakteriální katalasy)
Mechanismus účinku	inhibice biosyntézy mykolových kyselin buněčné stěny (napadá enzym mykolátsyntetasu, který je specifický pro mykobakterie), baktericidní působení na množící se bakterie, bakteriostatický účinek na klidová stádia, vysoce účinný na <i>M. tuberculosis complex</i> (<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. africanum</i> a <i>M. microti</i>)
Způsob podání	p.o.
Nežádoucí účinky	toxické účinky na periferní a centrální nervový systém (předchází se podáváním pyridoxinu), hepatotoxicita, alergie
Použití	v kombinaci k léčbě atypických TBC, dříve léčba lepry (<i>M. leprae</i>)

Ethambutol



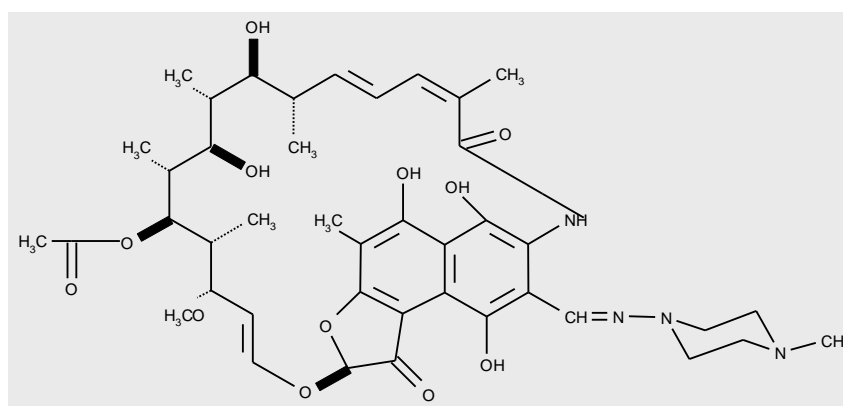
Typ léčiva	syntetický aminoalkohol, aktivita léčiva je stereospecifická, pravotočivý stereoizomer je nejaktivnější (<i>S,S</i> -izomer je 600krát účinnější než <i>R,R</i>), bakteriostatické působení proti většině mykobakteriím
Mechanismus účinku	inhibice syntézy buněčné stěny
Způsob podání	p.o.
Nežádoucí účinky	neuritida zrakového nervu až poškození sítnice, ustupuje po vysazení etambutolu, dále hyperurikémie
Použití	v kombinaci zejm. s isoniazidem a rifampicinem

Streptomycin



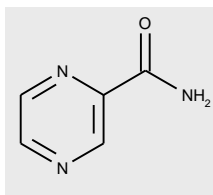
Typ léčiva	aminoglykosidové antibiotikum (izolováno ze <i>Streptomyces griseus</i>)
Mechanismus účinku	inhibice proteosyntézy (vazba na 30 S podjednotku ribosomu), baktericidní účinek
Způsob podání	i.m., popř. intratekální
Nežádoucí účinky	toxické účinky na periferní a centrální nervový systém, nefrotoxicita, alergie
Použití	také léčba bakteriální endokarditidy, brucelózy a tularémie

Rifampicin



Typ léčiva	semisyntetické antibiotikum odvozené od rifamycinu B, který byl izolován ze <i>Streptomyces mediterrani</i>
Mechanismus účinku	inhibuje prokaryotickou DNA-dependentní RNA polymerázu, (enzym nutný pro syntézu RNA), působí baktericidně i na klidová stádia mykobakterií (sterilizující účinky)
Způsob podání	p.o.
Nežádoucí účinky	ojedinele vyrážky, trombocytopenie, nefritidy, poruchy jaterních funkcí, neškodné oranžové zbarvení moči, potu a slz
Použití	v kombinaci především s isoniazidem nebo ethambutolem, kromě <i>M. tuberculosis</i> účinný i na atypická mykobakteria, <i>M. leprae</i> a další bakterie, např. <i>Staphylococcus aureus</i>

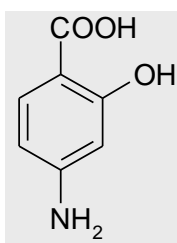
Pyrazinamid



Typ léčiva	strukturním analogem nikotinamidu, baktericidní a sterilizující efekt
Mechanismus účinku	antimetabolit nikotinamidu, proléčivo (intracelulárně přeměňován bakteriální amidasou na pyrazinkarboxylovou kyselinu, vlastní antituberkuloticky aktivní sloučeninu) velmi účinný na mykobakteria v intracelulárním prostoru makrofágů
Způsob podání	p.o.
Nežádoucí účinky	hepatotoxicita, léková horečka, hyperurikémie
Použití	v iniciační fázi TBC

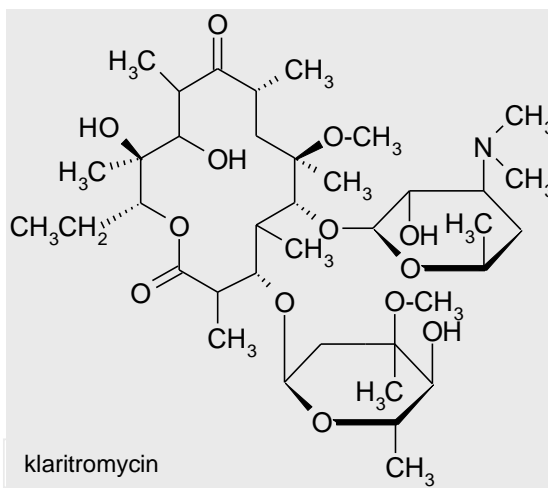
1.3.1.2 Další v současnosti používané antituberkuloticky aktivní látky

Paraaminosalicylová kyselina



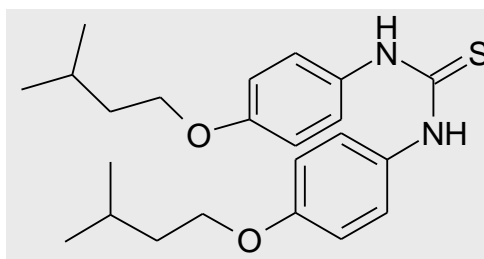
Typ léčiva	chemoterapeutikum (chemicky blízka sulfonamidům)
Mechanismus účinku	není zcela vyjasněn, předpokládá se určitý vliv na salicylát-dependentní biosyntézu
Způsob podání	p.o. ve vysokých dávkách (8-12 g denně)
Nežádoucí účinky	obecně jsou používané dávky špatně snášeny: GIT příznaky: anorexie, nauzea, pálení v epigastriu, vzácně peptické vředy, vysoké koncentrace v moči: krystalurie (nutno moč alkalizovat), hypersenzitivita (př. vyrážky)
Použití	příležitostně využívána pro terapii tuberkulózy způsobené multirezistentními kmeny mykobakterií

Makrolidy



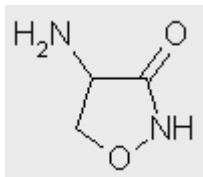
Typ léčiva	skupina antibiotik odvozených od erytromycinu (základem struktury je 14-členný makrocyclický lakton s připojenými cukernými zbytky) novější deriváty se od erytromycinu liší ve velikosti a substituci laktonového kruhu (př. klaritromycin, roxitromycin, , azitromycin, rokitamycin a spiramycin)
Mechanismus účinku	inhibice bakteriální proteosyntézy (vazbou na 50S podjednotku ribosomu způsobují disociaci peptidyl t-RNA)
Způsob podání	p.o. ve vysokých dávkách (8-12 g denně)
Nežádoucí účinky	zažívací potíže (nauzea, zvracení, průjem...)
Použití	širokospektrá antibiotika inhibující růst mykobakterií, avšak žádné z nich nevykazují dostatečně vysokou antituberkulotickou aktivitu

Isoxyl



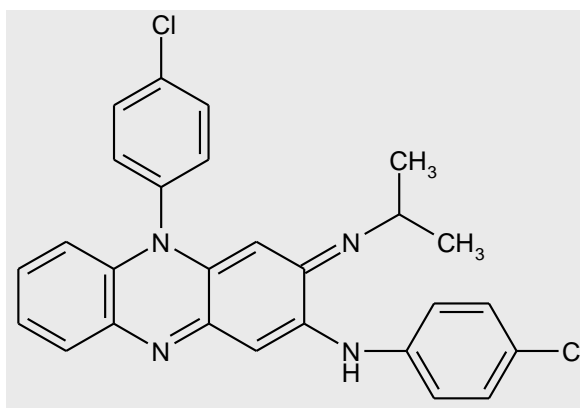
Typ léčiva	diacylderivát thiomocoviny (4,4'-diisoamyloxydifenylthiomocovina)
Mechanismus účinku	inhibice syntézy mykolových kyselin
Použití	byla prokázána účinnost na <i>M. bovis</i>

Cykloserin



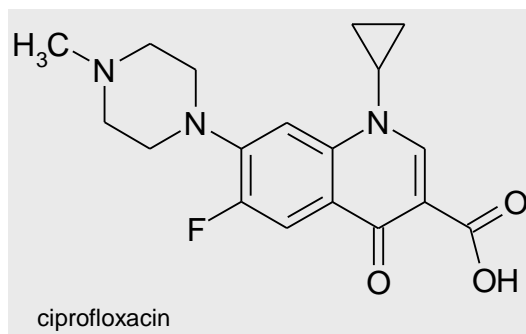
Typ léčiva	strukturní analog aminokyseliny D- alaninu
Mechanismus účinku	blokuje biosyntézu peptidoglykanu inhibicí enzymu D-alanin racemasa a D-alanin synthetasa
Nežádoucí účinky	závažné nežádoucí účinky v CNS, což značně omezuje jeho využití
Použití	široký antibakteriální účinek, včetně inhibice <i>M. tuberculosis</i>

Klofazimin



Typ léčiva	deriváty iminofenazinu
Účinky	kumulace v monocytech, navíc protizánětlivý účinek, pomalá eliminace, nízká incidence rezistence
Použití	především proti lepre, uplatnil se i v terapii některých mykobakterióz způsobených <i>M. intracellulare</i>

Fluorochinolony



Typ léčiva	syntetické deriváty nalidixové kyseliny
Mechanismus účinku	interagují s DNA-gyrasou a DNA-topoisomerasou
Nežádoucí účinky	celkově snášeny poměrně dobře, častější- nauzea, zvracení, průjem, bolesti hlavy, vzácně, ale závažnější- fotosenzitivita, nervové a psychické poruchy, záněty šlach, srdeční arytmie
Použití	ciprofloxacin a ofloxacin mají široký antimykobakteriální účinek, zejm. proti <i>M. tuberculosis</i> a <i>M. avium</i>

1.3.1.3 Látky ve vývoji¹⁰

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

- moxifloxacin- probíhá již klinické zkoušení
- SQ-109 (nová generace etambutolu)- přechází do klinické fáze testování
- diarylchinolony- přechází do klinické fáze
- PA-824 (nitroimidazoly)- v preklinické fázi zkoušek

❖ Fluorochinolony (moxifloxacin)

Jedná se syntetické deriváty kyseliny nalidixové. V terapii se v současnosti používají jako antituberkulotika druhé volby (tzv. rezervní léčiva) ciprofloxacin a ofloxacin.

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

Relativní antituberkulotická aktivita fluorochinolonů:

nejvyšší: gatifloxacin, moxifloxacin a sparfloxacin

střední: levofloxacin

nižší: ciprofloxacin, ofloxacin

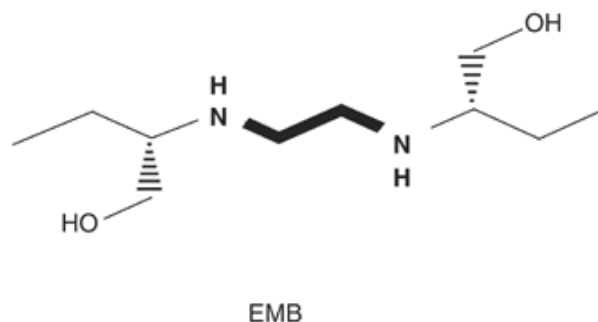
Charakteristické rysy fluorochinolonů:

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

❖ Nová generace etambutolu (SQ-109)

Etambutol- vlastnosti:

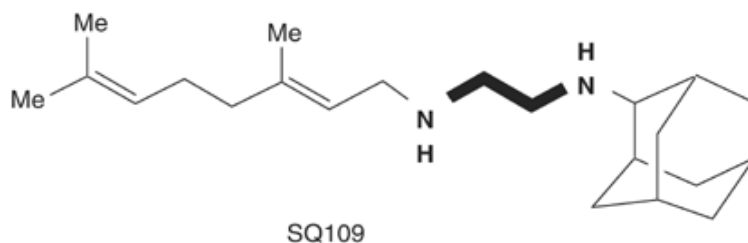
70- 80 % absorpce po p.o. podání,
biologický poločas 3- 4 hodiny,
bakteriostatické působení,
sérový peak po 2- 4 hodinách (p.o.),
používaná dávka je 25 mg/kg první dva
měsíce, v pokračovací fázi terapie
následuje podávání 15 mg/kg.



Mechanismus účinku: inhibice syntézy buněčné stěny

SQ-109- vlastnosti:

vysoká biologická dostupnost
po p.o. podání,
zakoncentrování v plicích,
dlouhý biologický poločas,
ekvivalentní aktivita k



etambutolu v koncentraci 1:100, baktericidní působení, účinný proti rezistentním
mykobakteriím, netoxický v dávce 1000 mg/kg, plně patentovaná ochrana.

Mechanismus účinku: ovlivňuje enzymy, které jsou důležité pro zaplétání dlouhých řetězců
mastných kyselin

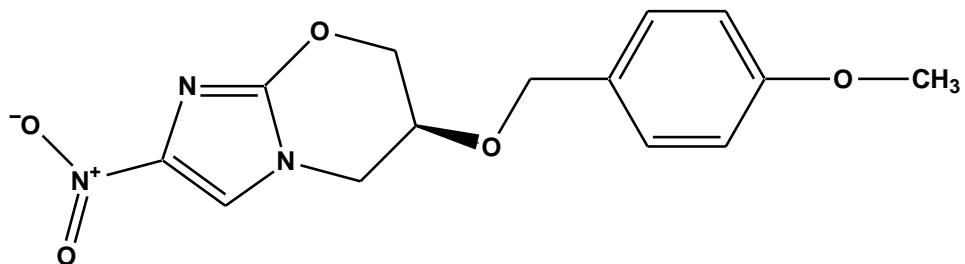
❖ Diarylchinolony

Nejvýznamnější látkou je R207910.

Mechanismus účinku: ovlivnění ATP synthasy *M. tuberculosis*.

❖ **Nitroimidazoly (PA-824)**

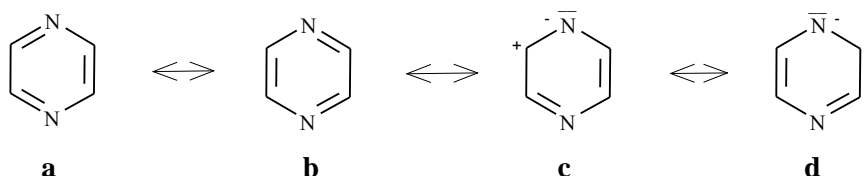
Vlastnosti: silná baktericidní aktivita,
úzké spektrum účinku (TBC specifické),
nadějná účinnost- srovnatelná s isoniazidem na zvířecích modelech,
působí i na latentní formy *M. tuberculosis* (nereplikující).



2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vlastnosti pyrazinového jádra

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



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

Srovnání aromaticity benzenu s některými dusíkatými heterocykly:¹¹

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

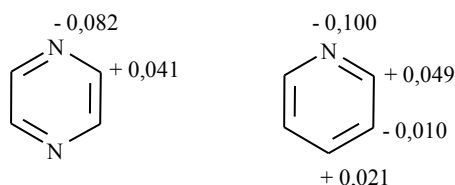
Pyrazin se chová jako slabá dvojsytná base, v porovnání s ostatními diaziny a pyridinem je však bazí nejslabší.

Srovnání bazicity některých dusíkatých heterocyklů:¹²

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

Z hodnot hustoty π -elektronů v pyrazinovém a pyridinovém kruhu je zřejmé, že hustota π -elektronů je zvýšená na dusíkových atomech, zatímco na uhlíkových atomech je hustota výrazně menší. Vypočtené hodnoty se od naměřených hodnot téměř neliší. Je patrné, že hustoty

π -elektronů na α -uhlících pyrazinu a pyridinu jsou velmi podobné a lze očekávat i podobnou chemickou reaktivitu α -substituovaných pyrazinů a pyridinu.

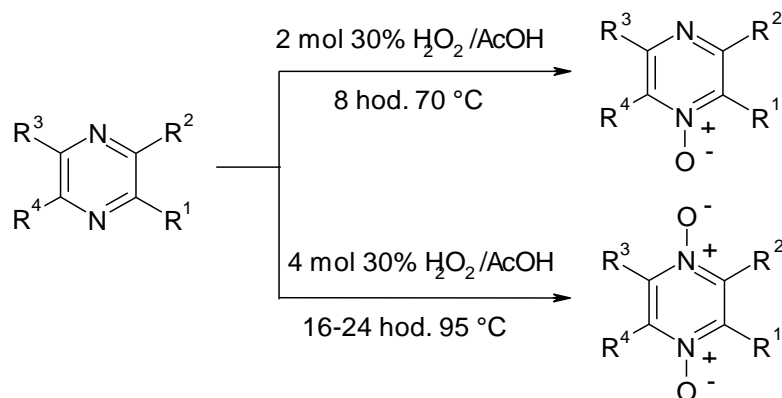


Meziatomové vzdálenosti u pyrazinu a ostatních diazinů jsou sice podobné, ale poloha druhého dusíkového atomu značně ovlivní geometrii molekuly. V případě pyrazinamidu je pyrazinový kruh planární, vzdálenost C-N je 13,48 nm, C-C potom 13,83 nm. Vlivem amidové skupiny dochází k protažení pyrazinového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

Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím, např. Friedel-Craftsovým aromatickým substitucím. Přímý elektrofilní atak je ztížen induktivním efektem dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou tedy substituce nukleofilní, obzvláště v případě, kdy se pyrazinový kruh aktivuje převedením na *N*-oxid. Z preparativního hlediska je významná nukleofilní substituce protonovaných heteroaromatických bází různými typy radikálů.¹²

2.2 Příprava N- oxidů pyrazinu

N-oxid pyrazinu se připravuje pomocí peroxidu vodíku v prostředí kyseliny octové. V závislosti na délce zahřívání, teplotě a molární koncentraci peroxidu vodíku přechází pyrazin na 1-mono- nebo 1,4-dioxid.¹³

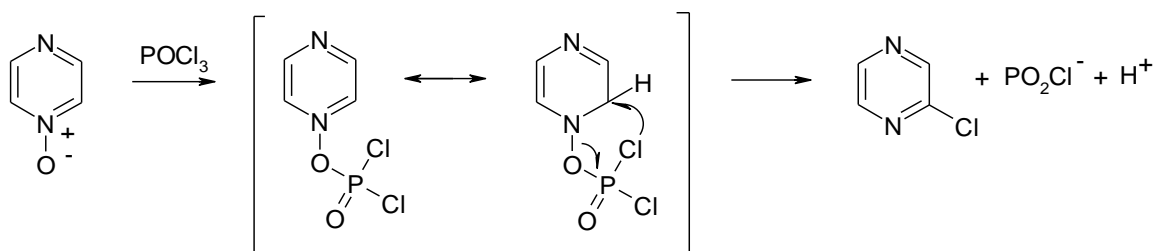


2.3 Halogenace pyrazinového jádra

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

Halogenderiváty lze připravit třemi klasickými způsoby:

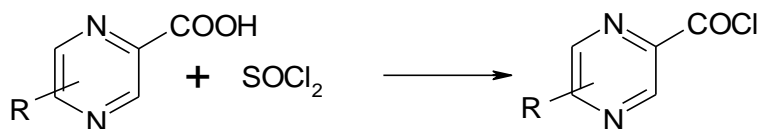
- přímou reakcí pyrazinu s halogenem v plynné fázi,
- záměnou hydroxyly či aminoskupiny na pyrazinovém jádře halogenem působením chloridu či bromidu fosforylu,
- nejčastější způsob- nukleofilní halogenace N-oxidu pyrazinu s chloridem fosforylu, která probíhá ponejvíce do polohy 2, méně pak do polohy 3 (při 105 °C, zahřívání 2 hodiny).



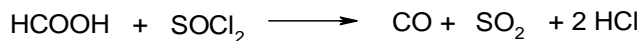
2.4 Příprava acylhalogenidů

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

K přípravě acylhalogenidů se používá reakce kyselin s halogenidy fosforu a síry: chloridem fosforečným, fosforitým a chloridem thionylu. Někdy je vhodným činidlem pro převádění kyselin na acylchloridy fosgen, popř. chlorid kyseliny šťavelové a pro práci s citlivými kyselinami benzoylchlorid.¹⁴



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:

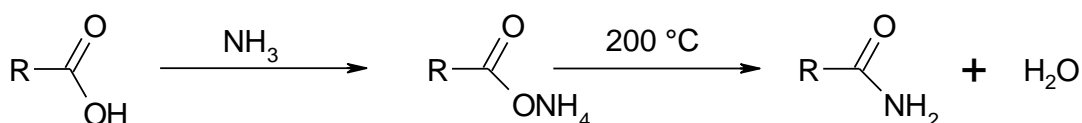


2.5 Příprava anlidů karboxylových kyselin

Zavedení pyrazinamidu do terapie tuberkulózy podnítilo široký a dlouhodobý výzkum ve skupině pyrazin-2-karboxylových kyselin, která tak představuje v chemii derivátů pyrazinu nejlépe prostudovanou skupinu.

Substituované amidy pyrazinkarboxylových kyselin lze připravit:

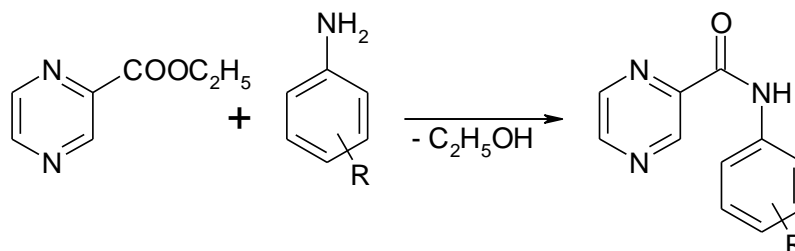
A) reakcí kyseliny- kyselina se převede na sůl s amoniakem, resp. s primárním či sekundárním aminem, následuje tepelný rozklad (za teploty kolem 200°C). Tímto způsobem lze získat primární, ale i sekundární a terciární amidy:¹⁴



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

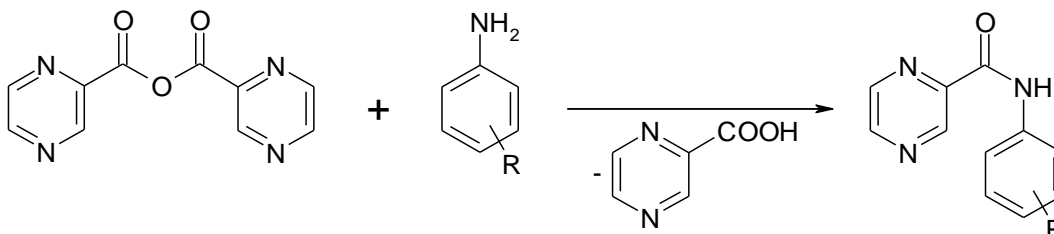
1. Aminolýza esterů pyrazinkarboxylových kyselin

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



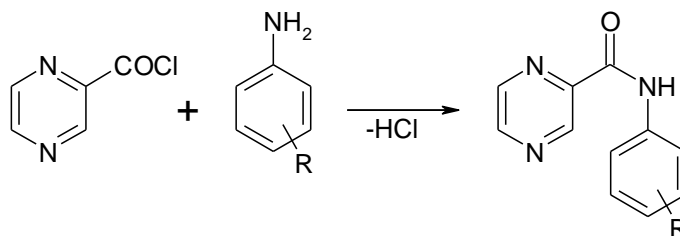
2. Aminolýza anhydridů kyselin

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



3. Reakce chloridu kyseliny s primárními či sekundárními aminy
(nejpoužívanější metoda)

K vázání uvolněné kyseliny se do reakce přidává pyridin (akceptor protonů) nebo jiný terciární amin, jinak uvolněný chlorovodík vyváže 1 mol aminu.¹⁴



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). Deriváty pyrazinu obsahující volnou karboxylovou skupinu byly vyvíjeny v soustavě propanol - amoniak (2:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím.

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.

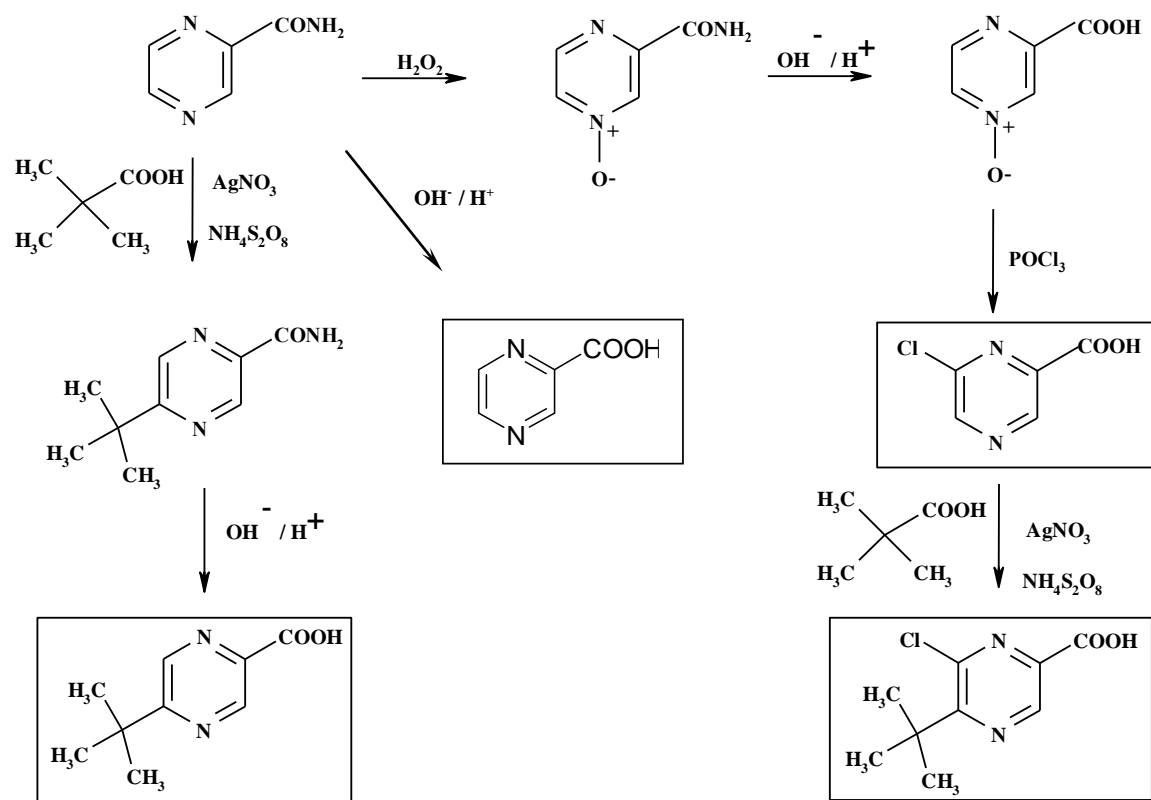
Infračervená spektra byla změřena paní Vencovskou na KAOCH FaF UK na spektrometru Nicolet Impact 400. Látky pevného charakteru byly měřeny v tabletách bromidu draselného (navážka 0,7 mg látky na 400 mg KBr), vlnočty jsou uváděny v cm^{-1} (15 mg v 0,25 ml rozpouštědla).

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Merkurs – 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 z KAOCH FaF UK. Chemické posuny jsou vztaženy k $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$.

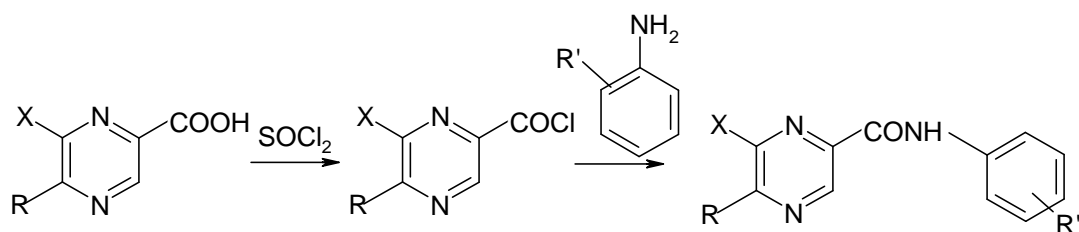
Log P sloučenin byl vypočten pomocí programu ACD/log P ver. 1.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto).

3.2 Schéma prováděných reakcí

3.2.1 Příprava výchozích pyrazin-2-karboxylových kyselin



3.2.2 Příprava vlastních anilidů

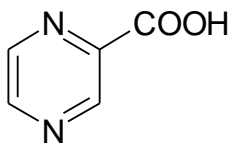


X = H, Cl

R = H, *tert*-butyl

R' = 2-F, 4-SH

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 asi dvě hodiny. Roztok se okyselí 15% kyselinou chlorovodíkovou. Vyloučené krystaly pyrazin-2-karboxylové kyseliny se odsají a překrystalizují z vody.

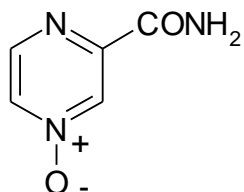
Molekulová hmotnost: 124,1 g/mol

Teplota tání: 223 – 225°C

(dle literatury¹⁶: 222 – 225°C za rozkladu)

Výtěžek: 28,7 g (96 % teoretického výtěžku)

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



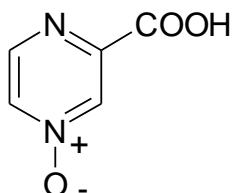
K roztoku 170 ml (5,55 mol) 30% peroxidu vodíku ve 260 ml (4,55 mol) ledové kyseliny octové se po částech přidá 64,0 g (0,52 mol) amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Směs se zahřívá na 70°C a poté se teplota udržuje na 70-80 °C šest hodin. Po ochlazení se reakční směs ponechá přes noc v lednici. Vyloučené krystaly se odsají, promyjí vodou a ethanolem. Krystalizace se provádí z vody.

Molekulová hmotnost: 139,1 g/mol

Teplota tání: 303 °C (za rozkladu),
(dle literatury¹⁵: 300°C, 302-305°C za rozkladu)

Výtěžek: 29,55 g (40,3 % teoretického výtěžku)

3.5 Příprava 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny



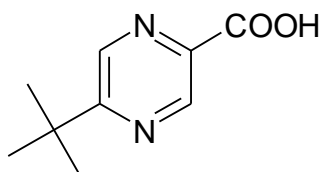
29,55 g (0,21 mol) 4-oxidu amidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny bylo osm hodin zahříváno k varu s 200 ml (0,50 mol) 10% roztoku hydroxidu sodného. Vyloučené krystaly sodné soli 4-oxidu pyrazin-2-karboxylové kyseliny byly odfiltrovány a poté rozpuštěny ve 100 ml horké vody. Roztok byl opět zfiltrován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

Molekulová hmotnost: 140,1 g/mol

Teplota tání: 202 – 203,5 °C
(dle literatury¹⁶: 212 – 213 °C)

Výtěžek: 25 g (85 % teoretického výtěžku)

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



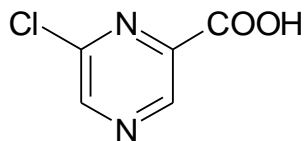
36,9 g (0,3 mol) pyrazin-2-karboxylové kyseliny se rozpustí v 60 ml vody zahřáté na 80 °C. K roztoku se přidá 5,1 g (0,03 mol) dusičnanu stříbrného a 30,64 (0,3 mol) kyseliny pivalové. Směs se intenzivně míchá jednu hodinu v trojhrdlé baňce a postupně se k ní přidává po kapkách roztok 75,24 g (0,33 mol) peroxidisíranu amonného ve 150 ml vody. Teplota reakční směsi se udržuje v rozmezí 75-80 °C. Po ochlazení se směs zalkalizuje 10% roztokem hydroxidu draselného na pH 9. Sraženina se odsaje. Výsledný produkt bílé barvy se překrystalizuje z horké vody.

Molekulová hmotnost: 180,1 g/mol

Teplota tání: 117 °C
(dle literatury¹⁷: 118-120 °C),

Výtěžek: 44,5 g (82 % teoretického výtěžku)

3.7 Příprava 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny



14 g (0,1 mol) 4-oxidu 2-pyrazinkarboxylové kyseliny bylo smícháno s 45,6 ml (0,5 mol) chloridu fosforylu. Směs byla zahřáta na teplotu 40-50 °C, poté teplota samovolně stoupla na 105 °C. Po asi 15 minutách došlo k ukončení reakce a obsah v baňce byl ochlazen na 10-15 °C. Reakční směs byla opatrně po malých částech vylita na led tak, aby teplota při hydrolýze nepřestoupila 50 °C. Nezareagovaný chlorid fosforylu se reakcí s vodou rozkládá, což je spojeno s uvolňováním tepla. Vzniklý vodný roztok byl kontinuálně extrahován chloroformem, rozpouštědlo bylo poté oddestilováno. Produkt byl překrytalizován z vody.

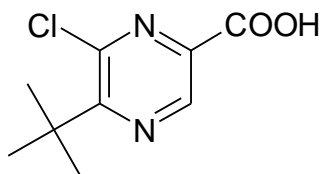
Molekulová hmotnost: 158,5 g/mol

Teplota tání: 153 °C

(dle literatury¹⁸: 154-155 °C)

Výtěžek: 10,3 g (65 % teoretického výtěžku)

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



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

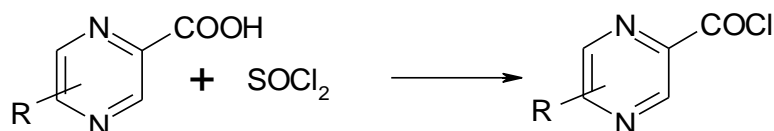
Molekulová hmotnost: 214,6 g/mol

Teplota tání: 107-110 °C
(dle literatury¹⁹: 108-110 °C)

Výtěžek: 4,59 g (51 % teoretického výtěžku)

3.9 Obecný postup přípravy anlidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny

3.9.1 Příprava chloridů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny

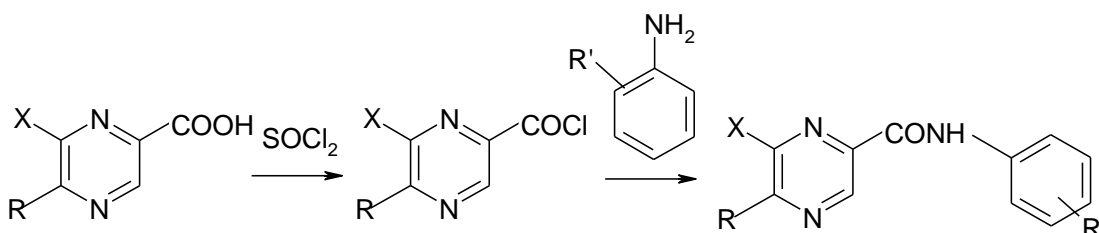


R = H, *terc.*butyl

X = H, Cl

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

3.9.2 Obecný postup přípravy anlidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny



X = H, Cl

R = H, *terc.*butyl

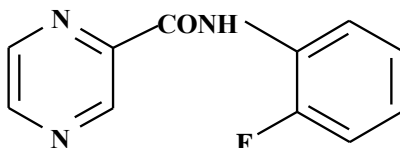
R' = 2-F, 4-SH

0,0017 mol substituovaného anilinu se rozpustí v 10 ml bezvodém acetonu v Erlenmayerově baňce opatřené magnetickým míchadlem. K roztoku bylo přidáno 0,0017 mol (0,14 g) bezvodého pyridinu. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače se po kapkách přidává

roztok 0,0017 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.

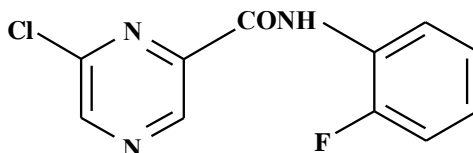
3.10 Nově připravené anilidy substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny a jejich charakteristiky

1. 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny



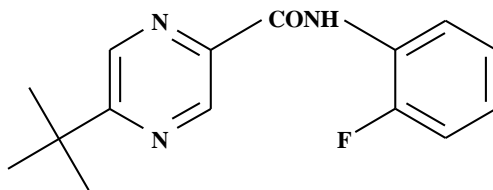
Výtěžek	0,18 g (51 %),
T _t	109-109,5°C
R _f	0,82
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



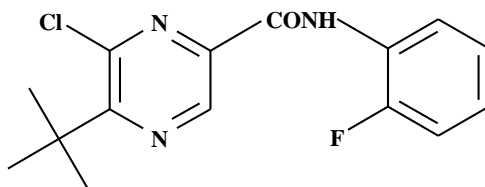
Výtěžek	0,07 g (22 %),
T _t	77,5-78,5 °C
R _f	0,92
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



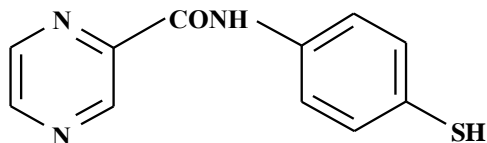
Výtěžek	0,14 g (46 %),
T _t	98,2-99,7°C
R _f	0,91
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



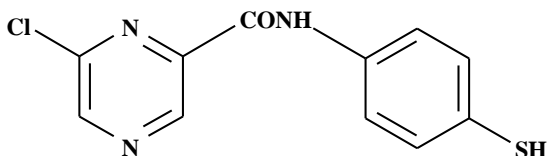
Výtěžek	0,060 g (21 %),
T _t	81,7°C
R _f	0,95
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



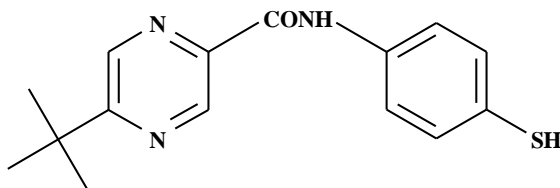
Výtěžek	0,060 g (16 %),
T _t	115-117°C
R _f	0,76
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



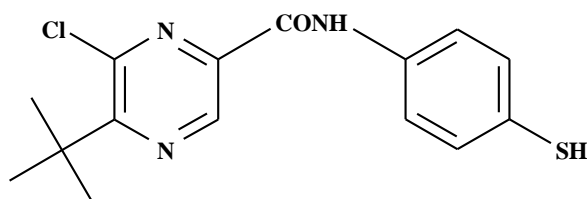
Výtěžek	0,086 g (26 %),
T _t	123-124°C
R _f	0,91
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



Výtěžek	0,05 g (16 %),
T _t	124°C
R _f	0,93
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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



Výtěžek	0,05 g (17 %),
T _t	80-81°C
R _f	0,92
Elementární analýza	
IČ spektrum (KBr), cm ⁻¹	
¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃)	
¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃)	

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.²⁰

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

4.2 Antimykotická aktivita

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

Připravené sloučeniny byly zkoušeny *in vitro* na antimykotickou aktivitu pomocí mikrodiluční bujónové metody. Testovaná látka byla dvojitě ředěna v roztoku RPMI 1640 s glutaminem, roztok byl pufrován na pH 7,0 pomocí 0,165 M roztoku MOPS. Konečné koncentrace látek se pohybovaly v rozmezí od 1000 do 0,975 µM. Součástí testování byly slepé pokusy (bez účinné látky). MIC byly odečítány po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C. V případě *Trichophyton mentagrophytes* byly MIC zaznamenány po 72 a 120 hodinách. Inkubace probíhala staticky, ve tmě, ve vlhké atmosféře. Odečítání výsledků bylo provedeno vizuálně, fotometricky (od 540 nm).

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

Candida albicans ATCC 44859 (CA1) *Trichosporon beigeli* 1188 (TB)
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)²¹

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

Pozn. MIC/IC₈₀ derivátů pyrazinu u ostatních testovaných kmenů byli příliš vysoké (většina >500 μmol/l).

U látky č. 5 nebyly testy provedeny.

Tabulka hodnot MIC/IC₈₀ v terapii běžně používaného flukonazolu (DIFLUCAN, MYCOMAX)

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

4.2 Herbicidní aktivita

4.2.1 Testování inhibice přenosu elektronů v chloroplastech

špenátu

Chloroplasty byly připraveny metodou dle Walkera²² 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 Kráľové²³. 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, systematicky 3-(3, 4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylurea.

4.2.2 Testování redukce obsahu chlorofylu v *Chlorella vulgaris*

Zelená řasa *Chlorella vulgaris* byla kultivována při pokojové teplotě metodou dle Kráľové²⁴. 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 Wellburna²⁵. 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.

Herbicidní aktivita připravených látek ve srovnání s účinností standardu DCMU

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

Pozn. Látku č. 8 nebylo možné testovat z důvodu nízké rozpustnosti v DMSO.

5 DISKUSE

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na syntézu látek ze skupiny anilidů substituované pyrazin-2-karboxylové kyseliny. Na katedře bylo v minulosti připraveno několik sérií látek tohoto typu.^{26,27,28,29,30}

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

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

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

Finální látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, ¹H a ¹³C NMR spektry, popř. i elementární analýzou.

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

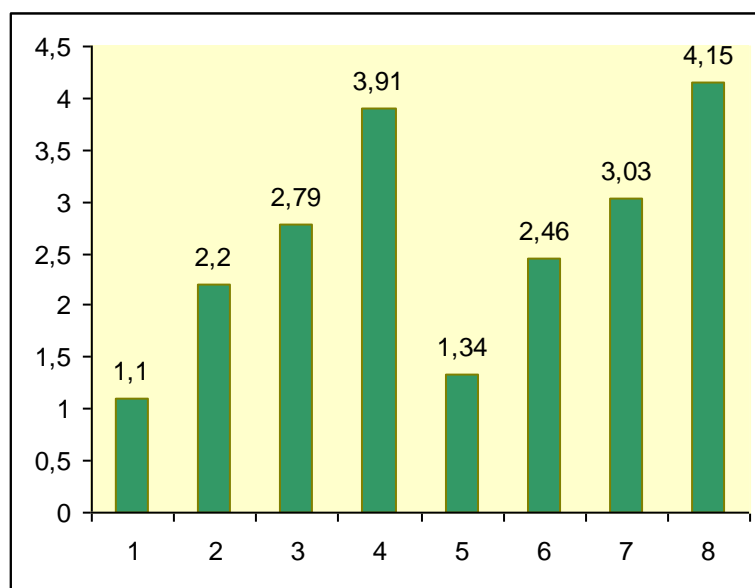
$$K = T_R - T_D / T_D$$

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

Tab. vypočítané lipofility (log *P*), chromatograficky stanoveného log *K* a čistoty látek

Látka č.	log <i>P</i>	log <i>K</i>	Čistota(%)
1	1,10 ± 0,46	0,4598	
2	2,22 ± 0,48	0,7651	
3	2,79 ± 0,47	1,0885	
4	3,91 ± 0,49	1,4465	
5	1,34 ± 0,45	0,4705	
6	2,46 ± 0,48	0,7725	
7	3,03 ± 0,47	1,0412	
8	4,15 ± 0,49	1,3414	

Graf log *P* jednotlivých sloučenin vypočítaný dle programu ACD/logP ver.1.0.



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

Všechny látky byly podrobeny testování na **antituberkulotickou aktivitu** v TAACF. Nejvyšší antimykobakteriální aktivitu *in vitro* vykazovaly sloučeniny č. **1 a 7** (2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny, (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny). Přesto zjištěné procento inhibice není příliš významné. Obě látky jsou substitucí jak pyrazinového, tak i benzenového jádra odlišné. Stejně tak se liší i ve své lipofilitě. Z těchto údajů lze obtížně určit vztah mezi strukturou a biologickým účinkem.

Jen těžko lze určit, zda větší roli v účinnosti látek hraje velikost nebo lipofilita molekuly. Např. pyrazinamid (běžně používán v terapii), je účinný pravděpodobně proto, že díky své malé molekule snadno pronikne přes mykobakteriální stěnu, přestože je velmi málo lipofilní. Velké naděje jsme vkládali do látky č. 8 ((4-merkaptofenyl)amid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny), která představuje sirný analog nedávno připravené látky (4-hydroxyanilid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny), která vykazovala relativně významnou antimykobakteriální aktivitu (97% inhibice při koncentraci 6,25 $\mu\text{mol/l}$, $\log P = 3,20$). Podle výsledků však zvýšením lipofility (teoretický předpoklad pro snadnější průnik přes vysoce lipofilní membránu *M. tuberculosis*), nedošlo ke zvýšení účinku.

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

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

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

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 pyrazin-2-karboxylové kyseliny.
3. Připravila jsem tyto v literatuře dosud nepopsané produkty:
 - 1) 2-fluoranilid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 2) 2-fluoranilid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 3) 2-fluoranilid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 4) 2-fluoranilid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 5) (4-merkaptofenyl)amid pyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 6) (4-merkaptofenyl)amid 6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 7) (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc.*butylpyrazin-2-karboxylové kyseliny
 - 8) (4-merkaptofenyl)amid 5-*terc.*butyl-6-chlorpyrazin-2-karboxylové kyselinyVýše uvedené produkty jsou charakterizovány teplotou tání, TLC, elementární analýzou, IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektry.
4. Série látek jsem podrobila *in vitro* biologickému hodnocení. Získala jsem údaje o antimykobakteriální, antifungální aktivitě a výsledky testů herbicidní aktivity.
5. Vypočetla jsem a graficky zpracovala log *P* nově připravených látek: Log *P* připravených sloučenin se pohyboval v rozmezí 1,1 a 4,15.
6. Pokusila jsem se zjistit vztah mezi strukturou, biologickou aktivitou a lipofilitou v sérii připravených látek (viz. Diskuse).

7 SEZNAM LITERATURY

1. Röslerová Z.: Syntéza substituovaných amidů pyrazin-2-karboxylové kyseliny jako potenciálních léčiv. Studentská vědecká konference, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005.
2. Doležal M., Palek L., Roslerová Z., Kuneš J., Buchta V., Kráľová K.: Substituted Pyrazinecarboxamides: Preparation and Biological Activity. Proceedings of ECSOC-8, The Eight International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, <http://www.mdpi.org/ecsoc-8.htm>, November 1-30, 2004, Editor: Julio A. Seijas & M. Pilar Vázquez Tato, CD-ROM edition, ISBN 3-906980-15-4, Published in 2004 by MDPI, Basel, Switzerland, (c) 2004 by MDPI, Basel, Switzerland
3. www.zdravcentra.cz (12.9.2005)
4. www.szu.cz (12.9.2005)
5. www.vakciny.net (12.9.2005)
6. <http://serverl.upol.cz> (12.9.2005)
7. Buchta V., Jílek P., Horáček J., Horák V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1998, s. 33.
8. Tripathi R.P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V.K.: Medicinal Research Reviews, Vol. 25, No.1, 93- 131, 2005
9. Lincová D., Farghali H., at al.: Základní a aplikovaná farmakologie, Praha, Galén, Karolinum 2002, Karolinum 2002, s. 461-3.
10. Veron Andrew: Clinical and Health Systems Branch, Division of TB Elimination, March 2005
11. Požarskij A F.: Chim. Geterocikl. Soedin., 7, 867 (1987)
12. Pratt Y. T.: The Pyrazines and Piperazines. In: Elderfield R. C.: Heterocyclic Compounds. Vol. 6 Willey & Sons, Inc.1957.
13. Klein B., Hetman N. E., O'Donnell M. E.: J. Org. Chem. 28, 1682 (1963).
14. Červinka O. a kol.: Chemie organických sloučenin, 1. vydání, 2. díl, SNTL, Praha, 1987, str. 49-50, 73-76.
15. Bernardi L. et al.: Gaz. Chim. Ital. 91, 1434 (1961). Chem. Abstr. 57, 2223 (1962).
16. Foks H., Janowiec M., Zieleniecki M.: Pol. J. Pharm. 29, 663 (1977).
17. Ambrogi V. et al.: Eur. J. Med. 15, 157 (1980).
18. Abe Y., Shigeta Y., Uchimaru F et al.: Japan Pat. 69 12, 898 (1969); Ref. Chem. Abstr. 71, 112979y (1969).
19. Doležal M., Hartl J., Miletín M., Macháček M., Kráľová K.: Chem Pap., 53, 126 (1999).
20. Kráľová K., Šeršeň F., Sidoová E.: Chem. Pap., **46**, 348 (1992).

21. Doležal M., Vičík R., Miletín M., , Kráľová K.: Chem Pap., 54, 245 (2000).
22. Walker, D.A. In Methods in Enzymology Part C; S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Ed.; Academic Press: New York, 69, 94-104 (1980).
23. Kráľová K., Šeršeň F., Sidoová E.: Chem. Pap.,46, 348 (1992).
24. Kráľová K., Šeršeň F., Melník M.: J. Trace Microprobe Techn.,16, 491 (1998).
25. Wellburn A.R.: J. Plant. Physiol., 144, 307 (1994).
26. Doležal M., Hartl J., Miletín M., et al.: Chem. Pap., 53, 126 (1999)
27. Doležal M., Vičík R., Miletín M., et al.: Chem. Pap., 54, 245 (2000)
28. Doležal M., Miletín M.,Hartl J, et al.: *4th Int. Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4)*, September 1-30, 2000 (<http://www.unibas.ch/mdpi/ecsoc-4/c0028/c0028.htm>).
29. Doležal M., Kráľová K., Šeršeň F., Miletín M.: *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 26, 13 (2001), (<http://www.faf.cuni.cz/fovia/26/2602dolezal.htm>).
30. Doležal M., Hartl J., Miletín M., et al.: *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 25,15 (2000), (<http://www.faf.cuni.cz/fovia/25/2502dolezal.htm>).